

SÉRIE A N° 1702

N° D'ORDRE :

2568

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Marguerite LOURAU-DESSUS

1^{re} THÈSE — RECHERCHES SUR LA NATURE DES ANTICORPS.

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenu(e) le 27 May 1937 devant la Commission d'examen

MM. L. LAPICQUE . . . Président.

ROBERT-LÉVY . . . }
E. AUBEL . . . } Examinateurs.

PARIS

LES PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE

49, Boulevard Saint-Michel, 49

SÉRIE A N° 1702

N° D'ORDRE :

2568

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Marguerite LOURAU-DESSUS

1^{re} THÈSE — RECHERCHES SUR LA NATURE DES ANTICORPS.

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1937 devant la Commission d'examen

17 MAR 1937

MM. L. LAPICQUE *Président.*

ROBERT-LÉVY

E. AUBEL } *Examineurs.*

PARIS

LES PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE

49, Boulevard Saint-Michel, 49

1937

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire M. MOLLIARD.
Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

<i>Professeurs honoraires...</i>	H. LEBESGUE.	GUILLET.	JANET.
	A. FERNBACH.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
	A. LEDUC.	FREUNDLER.	MARCHIS.
	Émile PICARD.	AUGER.	VESSIOT.
	Rémy PERRIER.	BLAISE.	PORTIER.
	Léon BRILLOUIN.	DANGEARD.	

PROFESSEURS

G. BERTRAND.....	T	Chimie biologique.	M. JAVILLIER.....	Chimie biologique.
M. CAULLERY.....	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	L. JOLEAUD.....	Paléontologie.
			ROBERT-LÉVY.....	Zoologie.
G. URBAIN.....	T	Chimie générale.	F. PICARD.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
Émile BOREL.....	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	Henri VILLAT.....	T Mécanique des fluides et applications.
Jean PERRIN.....	T	Chimie physique.	Ch. JACOB.....	T Géologie.
H. ABRAHAM.....	T	Physique.	P. PASCAL.....	T Chimie minérale.
E. CARTAN.....	T	Géométrie supérieure.	M. FRÉCHET.....	T Calcul différentiel et calcul intégral.
M. MOLLIARD.....	T	Physiologie végétale.	E. ESCLANGON.....	T Astronomie.
L. LAPICQUE.....	T	Physiologie générale.	M ^{me} RAMART-LUCAS	T Chimie organique.
A. COTTON.....	T	Recherches physiques.	H. BÉGHIN.....	T Mécanique physique et expérimentale.
J. DRACH.....	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	FOCH.....	Mécanique expérimentale des fluides.
Charles FABRY.....	T	Enseignement de Physique.	PAUTHENIER.....	Physique (P. C. B.).
Charles PÉREZ.....	T	Zoologie.	De BROGLIE.....	T Théories physiques.
Léon BERTRAND...	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	CHRÉTIEN.....	Optique appliquée.
E. RABAUD.....	T	Biologie expériment.	P. JOB.....	Chimie générale.
M. GUICHARD.....		Chimie minérale.	LABROUSTE.....	Physique du Globe.
Paul MONTEL.....	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	PRENANT.....	Zoologie.
P. WINTREBERT...	T	Anatomie et histologie comparées.	VILLEY.....	Mécanique physique et expérimentale.
L. BLARINGHEM...	T	Botanique.	BOHN.....	Zoologie (P. C. B.).
O. DUBOSCQ.....	T	Biologie maritime.	COMBES.....	Botanique (P. C. B.).
G. JULIA.....	T	Mécanique analytique et mécan. céleste.	GARNIER.....	T Mathématiques générales.
C. MAUGUIN.....	T	Minéralogie.	PÉRÈS.....	Mécanique des fluides
A. MICHEL-LÉVY...	T	Pétrographie.	HACKSPILL.....	Chimie (P. C. B.).
H. BÉNARD.....	T	Mécanique expérimentale des fluides.	LAUGIER.....	Physiologie générale.
A. DENJOY.....	T	Application de l'analyse à la géométrie.	TOUSSAINT.....	Technique Aéronautique.
L. LUTAUD.....	T	Géographie physique et géologie dynamique.	M. CURIE.....	Physique (P. C. B.).
Eugène BLOCH.....	T	Physique théorique et physique céleste.	G. RIBAUD.....	T Hautes températures.
G. BRUHAT.....		Physique.	CHAZY.....	T Mécanique rationnelle.
E. DARMOIS.....		Physique.	GAULT.....	Chimie (P. C. B.).
A. DEBIERNE.....	T	Physique générale et radioactivité.	CROZE.....	Recherches physiques
A. DUFOUR.....	T	Physique (P. C. B.).	DUPONT.....	T Théories chimiques.
L. DUNOYER.....		Optique appliquée.	LANQUINE.....	Géologie.
A. GUILLIERMOND..	T	Botanique.	VALIRON.....	Mathématiques générales.
			BARRABÉ.....	Géologie structurale et géologie appliquée.
			MILLOT.....	Zoologie (P. C. B.).
			F. PERRIN.....	Théories physiques.
			VAVON.....	Chimie organique.
			G. DARMOIS.....	Calcul des Probabilités et Physique
				Mathématique.

Secrétaire A. PACAUD.
Secrétaire honoraire..... D. TOMBECK.



RECHERCHES SUR LA NATURE DES ANTICORPS

INTRODUCTION

I

On n'a jamais, jusqu'ici, établi de distinctions essentielles entre un anticorps et les globulines de l'antisérum. Les tentatives qui ont été faites pour les séparer ont échoué pour la plupart, (HUNTOON (¹, ²)), SÉDALIAN et CLAVEL (³ etc.) et les auteurs qui, obtenant des solutions spécifiquement actives dépourvues de *traces décelables* de protéines, pensent pouvoir conclure à l'individualité des anticorps, se méprennent sur la portée de cette observation. Il est, en effet, bien évident que les méthodes d'identification de l'une et de l'autre substance sont de trop inégale sensibilité pour qu'une telle interprétation s'impose sans discussion. (OLITZKI (⁵ et ⁴)).

Un seul résultat mériterait d'être retenu : celui de FRANKEL, (⁶), qui assure pouvoir obtenir une *agglutinine pure à l'état solide*. Il est toutefois regrettable que cet auteur n'ait pu décrire de technique précise qui permette de reproduire ses expériences, et que lui même apporte si peu de données nouvelles sur la nature des anticorps ; il ne définit, en effet, le solide qu'il a isolé, — en dehors de ses propriétés biologiques — que par des caractères purement négatifs : absence des réactions des protéines et des lipoides.

Mais, en admettant même qu'ils soient différents, globulines et anticorps n'en restent pas moins des substances voisines, possédant des propriétés communes, sur lesquelles sont précisément fondées les techniques chimiques employées pour les isoler. C'est là, sans doute, la raison de l'échec auquel ces méthodes semblent vouées, et c'est ce qui nous a incité à rechercher dans un domaine tout autre un moyen de caractériser ces deux corps, sans qu'il soit nécessaire de les obtenir au préalable à l'état de pureté.

L'électrophorèse nous a paru offrir cette possibilité.

II

L'électrophorèse est le transport dans un champ électrique de particules chargées. Le phénomène observé : sens et vitesse de déplacement, définissent le signe électrique et la densité de charge du grain.

Ce transport a été interprété de deux manières. Pour certains, (HARDY (⁷),

il serait dû à des phénomènes d'électrisation de contact ; le signe électrique dépendrait donc seulement de la nature des ions adsorbés, et la densité de charge, de l'épaisseur de la couche double qui entoure chaque particule.

Cette conception, valable, avec des réserves, pour quelques suspensions colloïdales, ne peut convenir à toute une classe de colloïdes, (savons, certaines matières colorantes) qui, se comportant comme de véritables électrolytes, s'ionisent en solution, et possèdent uniquement une charge de valence. C'est à ce groupe qu'appartiennent les protéines, et, probablement aussi, les anticorps.

LOEB, le premier, ⁽⁸⁾ a montré que les protéines peuvent se combiner à la fois aux acides et aux bases, et que cette combinaison suit les lois de la stœchiométrie. Les courbes de mobilité en fonction du pH (mobilité vraie mesurée par une méthode d'observation microscopique directe) se superposant aux courbes de titrage, (ABRAMSON ⁽¹⁷⁾), la charge électrique semble bien liée à la structure chimique de ces molécules, à leur caractère amphotère, qui leur permet de se comporter comme des anions ou comme des cations selon la réaction du milieu.

* Les groupes ionisables sont, en effet, de deux sortes : des groupes carboxyles, $COOH$, seuls dissociés en milieu alcalin, et des groupes aminés, NH^2 , ionisés au contraire en milieu acide. Sens et vitesse de déplacement dépendent, pour une valeur de champ déterminée, du nombre et de la nature des fonctions dissociées, c'est-à-dire, en définitive, du pH du milieu. En milieu acide, l'ampholyte se comporte comme une base, et se déplace vers la cathode ; en milieu alcalin, il se comporte comme un acide, et se transporte vers l'anode.

On peut enfin définir une valeur de pH pour laquelle fonctions acides et basiques dissociées étant en même nombre, la charge moyenne de l'ampholyte est nulle, et nul également son transport dans le champ. Ce pH , désigné par pHi , point isoélectrique de la molécule, dépend uniquement de la valeur de ses constantes d'ionisation ; il est, en particulier, indépendant de la taille et de la forme des grains. C'est une propriété appartenant à la surface de la micelle, capable, par conséquent, de la caractériser.

D'après HARDY ⁽¹⁰⁾, des suspensions de globulines de différentes grosseurs micellaires se transportent avec la même vitesse dans un champ électrique. De même, des suspensions d'argent colloïdal préparées selon la méthode de Bredig, possèdent la vitesse de l'ion argent.

Des particules de quartz, de collodion, d'huile, etc. recouvertes d'une pellicule de protéines, acquièrent les propriétés de ces protéines dissoutes, point isoélectrique, densité de charge. (LOEB, ABRAMSON ^(11, 12, 13)).

On peut donc, par cataphorèse, déterminer le pH auquel l'ampholyte est immobile, et connaître, par là, son point isoélectrique, caractéristique de sa structure moléculaire.

Mais il est des cas où des phénomènes secondaires, — qui sont peut-être des phénomènes d'adsorption au sens de l'électrisation de contact de Perrin —, interviennent à côté de ces processus d'ionisation, de sorte que la charge de l'ampholyte ne s'inverse plus à pHi .

En présence de ferro-cyanure de sodium, par exemple, (anion ———), la gélatine reste

électronégative dans des milieux très acides ; avec du chlorure de lanthane, au contraire, (cathion $+++$), son transport ne s'inverse plus à pH_i , mais à des pH beaucoup plus alcalins. (LOEB ⁽⁹⁾).

L'importance de ces phénomènes dépend naturellement de la valence de l'ion actif, et de sa concentration dans la solution. La nature et la concentration de l'ampholyte interviennent aussi pour une part.

On ne peut ainsi déterminer qu'un point isoélectrique apparent ; ce n'est plus une grandeur qui caractérise l'ampholyte et la structure de sa molécule, puisqu'elle dépend aussi de facteurs constitutifs du milieu extérieur. Si l'on veut donc atteindre, par cataphorèse, le point *isoélectrique vrai* de la molécule, ou une valeur voisine, il importe de se placer dans des conditions où ces phénomènes secondaires soient le plus possible réduits.

C'est ainsi qu'en cataphorant de la sérum albumine en présence des seuls ions monovalents Cl et Na, TISELIUS, KÖNIG et PAULI, ont pu déterminer un point isoélectrique voisin de celui que l'on obtient, par le calcul, à partir des constantes d'ionisation de ses fonctions acides et basiques. AUDUBERT ^[14]).

III

Dans les zones de pH éloignées de pH_i , la densité de charge de l'ampholyte, sa vitesse par conséquent, dépendent du nombre de fonctions $COOH$, et NH^2 dissociées.

Mais cette *vitesse vraie* — qui permettrait seule de calculer la charge réelle — ne peut être mesurée dans les conditions où l'on doit forcément se placer pour cataphorer un immunsérum, car les ions et micelles qu'il contient ne se meuvent pas dans un milieu immobile, mais dans un liquide soumis à des mouvements divers, tels par exemple, l'osmose électrique et le reflux hydrostatique. Ces phénomènes sont ceux qui entraînent les perturbations les plus importantes, d'ailleurs inhérentes à la méthode elle-même. (PERRIN ⁽¹⁵⁾).

Le tube de verre possède, en effet, une charge négative due à une couche d'ions (OH^-) immobiles contre la paroi. Dans le liquide, une couche d'ions (H^+) leur fait équilibre ; comme ces ions sont mobiles, ils se déplacent vers la *cathode* sous l'action d'un champ parallèle à l'axe du tube, entraînant, de proche en proche, avec des vitesses décroissantes, les couches liquides voisines, et les particules qu'elles contiennent. A une certaine distance, ce mouvement s'annule.

Au centre du tube, un courant de sens inverse, (reflux hydrostatique) entraîne vers le pôle opposé, les particules de la solution ; il va en s'atténuant et cesse également à une distance donnée du centre du tube.

C'est donc dans une zone étroitement définie, que la vitesse vraie d'une particule peut être observée ; et seules, des méthodes d'observation directe, valables pour des particules visibles au microscope ou à l'ultramicroscope, permettent cette mesure. (Méthode utilisée par LOEB, NORTROP et KUNITZ, ABRAMSON, HITCHCOCK, FALK etc...) ^(16, 17, 18)).

La longueur de nos expériences, qui entraîne une variation considérable dans la valeur du champ, et surtout la nature des anticorps et des procédés employés pour les identifier, ne permettent ni une observation directe de leur dépla-

cement, ni une détermination de leur charge réelle. Nous n'atteignons qu'un *mouvement apparent*, qu'une *vitesse moyenne* portant sur l'ensemble des particules de la solution.

Nos mesures seront donc essentiellement comparatives ; elles cherchent à mettre en évidence une *différence* dans le comportement des constituants de l'immunsérum : protéines et anticorps, cataphorés dans le même milieu, et dans des conditions en tout point identiques.

Il faut cependant observer que ni l'osmose électrique, ni le reflux hydrostatique, ne peuvent empêcher une détermination exacte du point isoélectrique. Ces mouvements sont de sens inverse et égaux, puisqu'il y a équilibre ; ils s'annulent par conséquent, et n'ont d'autre effet que d'entraîner vers l'un et l'autre pôle un nombre égal de particules de même nature.

Pour la même raison, les vitesses moyennes apparentes que nous mesurons traduisent avec fidélité le *rapport* qui existe entre les vitesses réelles, absolues, que nous ne pouvons atteindre.

BIBLIOGRAPHIE

- (¹) F. M. HUNTOON, *Journal of Immunol.*, **6**, 117 (1921).
F. M. HUNTOON et S. ETRIS, *Journal of Immunol.*, **6**, 123 (1921).
F. M. HUNTOON, P. MASUCCI et HANNUM, *Journal of Immunol.*, **6**, 185 (1921).
- (²) F. M. HUNTOON, P. MASUCCI et HANNUM, *Journ. Amer. Chem. Soc.*, **42**, 2654 (1920).
- (³) P. SEDALIAN et J. CLAVEL, *C. R. Soc. Biol.*, **115**, 60-61-1142-1155 (1934).
- (⁴) M. FRANKEL et L. OLITZKI, *Nature*, **126**, 723 (1930).
M. FRANKEL et L. OLITZKI, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **28**, 492 (1931).
- (⁵) L. OLITZKI, *Journ. of Immunol.*, **24**, 505 (1933).
- (⁶) M. FRANKEL, *Proc. of Royal Soc.*, (B), **111**, 776 (1932).
- (⁷) W. HARDY, *Proc. of Royal Soc.*, (B) **66**, 110 (1900).
- (⁸) J. LOEB, *Les Protéines. Trad. Mouton*, Paris Alcan, 1924.
- (⁹) J. LOEB, *Journ. of Gen. Physiol.*, **5**, 395 (1923).
- (¹⁰) W. HARDY, *Journ. of Gen. Physiol.*, **33**, 225 (1905-06).
- (¹¹) A. H. ABRAMSON et L. MICHAELIS, *Journ. of Gen. Physiol.*, **12**, 587 (1928).
- (¹²) A. H. ABRAMSON, *Journ. of Gen. Physiol.*, **13**, 169 (1930).
- (¹³) A. H. ABRAMSON, *Journ. of Gen. Physiol.*, **15**, 575 (1932).
- (¹⁴) R. AUDUBERT, *Propriétés électrochimiques des protéines*, Paris, Hermann, 1935.
- (¹⁵) J. PERRIN, *Journal de Chimie-Physique*, **2**, 601 (1904).
- (¹⁶) J. H. NORTHROP, *Journ. Gen. Physiol.*, **4**, 609 (1922).
- (¹⁷) M. KUNITZ, *Journ. of Gen. Physiol.*, **6**, 413 (1923).
- (¹⁸) K. G. FALK, *Amer. Journ. Pub. Health.*, **17**, 714 (1927).

TECHNIQUES

I. — DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

L'électrophorèse des immunosérums, toxines, antitoxines etc., a tout d'abord été faite au moyen d'un dispositif très simple, décrit et utilisé par HARDY (¹ et ²). Il consiste en un simple tube en U contenant le sérum, dans lequel plongent directement des électrodes en platine. Les observations sont évidemment gênées ou faussées par le dégagement de produits d'électrolyse qui coagulent les albumines, et altèrent les propriétés du liquide. (³, ⁴, ⁵, etc...).

Pour empêcher leur formation, V. HENRI (⁶, ⁷, ⁸) s'est servi de solutions longuement dialysées; ce procédé, qui est séduisant, ne peut être utilisé avec du sérum, dont les globulines subissent en l'absence de sels, des transformations irréversibles.

Bien d'autres dispositifs ont encore été proposés: très variés dans leur détail,

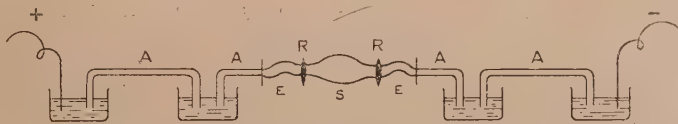


Fig. 1. — Appareil de TEAGUE et BUXTON

A : gels d'agar-agar.

E : eau distillée.

S : sérum.

R : robinets.

ils restent cependant très voisins, dans leur principe, des appareils représentés dans les figures 1 et 2.

FIELD, TEAGUE et BUXTON (⁹ et ¹⁰) (fig. 1), placent auprès des électrodes des arcs de gélose destinés à ralentir la progression de l'acide et de l'alcali qui s'y dégagent. La réaction du liquide ne change guère; en effet, au cours de l'expérience, mais le gel choisi est le siège d'une électrosmose puissante dirigée de l'anode vers la cathode, qui entraîne indistinctement toutes les particules dissoutes ou suspendues dans la solution comprise entre deux arcs voisins. C'est, en effet, toujours à la *cathode* que ces auteurs retrouvent la totalité des éléments du liquide cataphoré: propriétés toxiques, agglutinantes, hémolysantes, protéinés etc.

On voit donc que ce dispositif, et tous ceux qui en dérivent, (appareils de

TODD, ⁽¹¹⁾ KLIGER, ⁽¹²⁾ OLITZKI ⁽¹³⁾ GUASTALLA, ⁽¹⁴⁾ etc.) ne permettent pas de réaliser des expériences correctes d'électrophorèse, et ne peuvent être retenus.

Au début de nos recherches, nous avons également rempli de gélose les tubes A et A' de notre appareil (fig. 3).

Ces tubes étant ouverts, le sérum, compris entre S et S', est mis à l'abri du courant osmotique. Mais la gélose se déshydrate très fortement, et à la faveur de l'espace laissé libre entre le gel rétracté et le tube de verre, passent librement, entraînés par l'osmose, les ions (H) et le métal de l'électrode positive, qui atteignent rapidement la partie centrale de l'appareil. Même dans ces conditions, la gélose ne peut pas être conservée.

Le dispositif qui a été le plus fréquemment utilisé est celui de LANDSTEINER et PAULI ⁽¹⁵⁾, repris par MICHAELIS ⁽¹⁶⁾ [Fig. 2] : le sérum est simplement séparé

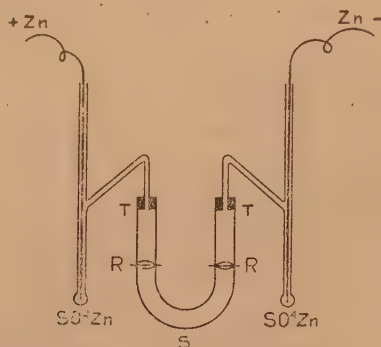


Fig. 2. — Appareil de MICHAELIS.

T : solutions tampons.

S : sérum.

R : robinets.

des électrodes par des tubes remplis d'eau ou de solution saline. La diffusion des produits dégagés aux électrodes est évidemment très rapide, ce qui limite aussi bien la durée des essais que la valeur des champs employés ; mais même dans des expériences de courte durée (20' à 1 heure) MICHAELIS note d'importantes variations de pH , que l'adjonction au sérum de mélanges tampons ne suffit pas à éviter ^(17, 18, 19). On retrouve parfois aussi dans la partie centrale de l'appareil l'ion métallique (Cu, Zn) de la solution dans laquelle plonge l'électrode positive, et qui se déplace naturellement vers la cathode.

Il peut alors gêner le titrage des sérums : des traces de zinc par exemple, suffisent à empêcher ou à retarder l'hémolyse, à agglutiner les globules rouges etc.

Nous avons donc essayé de combiner les avantages des deux systèmes, conservé par conséquent des milieux solides, mais éliminé tous ceux qui provoquent de l'osmose électrique, des modifications de pH , ou une altération des propriétés spécifiques des antisérums.

Nous avons enfin adapté notre dispositif à l'objet de nos recherches : électrophorèse de colloïdes peu mobiles, facilement altérés par la chaleur, et dont les méthodes de titrage présentent des caractères particuliers.

DESCRIPTION DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Réalisation de hauts voltages. — La nécessité d'utiliser de hauts voltages, qui entraînent, avec des solutions conductrices d'importants dégagements de chaleur, nous a conduit à construire un appareil parfaitement isolé, facile à refroidir, et à réduire le plus possible la quantité de chaleur dégagée.

Notre dispositif, représenté dans la figure 3, se compose de trois tubes de verre en forme d'U, ouverts à leurs extrémités. Des ajustages latéraux les mettent en communication ; ils sont terminés par des rodages plans que maintiennent des colliers de duraluminium. (S et S').

Cet appareil est étanche, et peut être immergé dans un réfrigérant liquide (glace et sel marin complété par de l'eau), sans que l'on ait à craindre la production de courants de dérivation.

Pour réduire la chaleur dégagée, nous avons augmenté la résistivité du

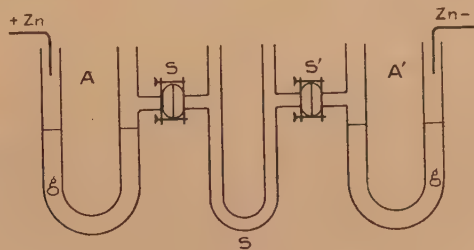


Fig. 3. — Dispositif expérimental.

S : sérum.

A et A' : tubes latéraux contenant une solution de NaCl, des gels de gélatine (g) et les électrodes, constituées par une lame de Zn plongeant, à l'anode, dans une solution alcaline de zincate de soude, à la cathode, dans une solution acide de chlorure de Zn. S' : rodages plans entre lesquels on place des disques de papier dialyseur.

système au détriment de l'intensité du courant, diminué par conséquent la section du tube S, et abaissé la conductivité du milieu jusqu'à la limite compatible avec la stabilité des globulines. On peut ainsi, en diluant du sérum à 1/30^e au moins, abaisser la concentration saline jusqu'à 0 gr. 5 % de NaCl, ce qui permet d'atteindre, avec un tube de 3 mm. 5 de diamètre intérieur, un champ de 30 à 35 volts cm., la température du liquide ne dépassant pas 20 à 25 °.

Possibilité d'effectuer des titrages précis. — Entre les rodages, obturant la lumière du tube, nous avons placé une membrane hémiperméable ; elle limite le sérum, qui remplit le tube S, et le sépare de la solution saline qui occupe les tubes A, A',

Ce dispositif permet de faire des titrages précis, qui sont nécessaires à la correcte interprétation d'une expérience d'électrophorèse.

Il ne suffit pas en effet, de noter à l'un des pôles l'affaiblissement de l'une des propriétés du sérum pour conclure qu'elle se déplace en sens inverse. Il faut aussi retrouver au pôle opposé un

accroissement d'activité qui compense quantitativement cet affaiblissement. Alors seulement, on est en droit d'affirmer :

- a) Que les propriétés du liquide soumis au champ n'ont pas été modifiées au cours de l'expérience.
- b) Qu'elles sont liées à un grain de matière portant une charge électrique.

Ce dispositif rend également possible des *mesures de mobilité* qui n'avaient jusqu'ici jamais été tentées dans la cataphorèse des anticorps. Dans les dispositifs couramment utilisés, la recherche des propriétés spécifiques des immun-sérums se faisait, après expérience, dans le liquide (eau, solution saline ou solution tampon) ou dans le gel qui surmontait le sérum (fig. 1 et 2).

Cette méthode est excellente lorsque le déplacement peut être observé *in situ*, soit que la surface de séparation des deux liquides soit nettement visible (émulsions à gros grains ⁽¹⁹⁾, solutions colorées ⁽²⁰⁾), soit que le réactif précipitant puisse être versé dans le tube à cataphorèse lui-même. (MICHAELIS, ⁽¹⁸⁾). Sinon, la substance recherchée se trouve diluée dans la totalité du liquide prélevé : inconvénient grave lorsqu'on opère avec des particules faiblement chargées ou à des *pH* voisins de leur point isoélectrique. Il devient dès lors impossible de donner à ce point une valeur précise : on ne peut que définir une large zone de *pH* où le déplacement est sensiblement nul.

En outre, une dilution excessive entraîne des erreurs dans le titrage des antisérums, dont la sensibilité et l'exactitude dépendent de la concentration de l'anticorps présent dans la solution (Voir p. 12).

Notre procédé ne possède pas ces éléments d'indétermination, puisque les titrages sont faits directement dans les fractions anodiques et cathodiques du sérum cataphoré : leur activité est comparée à celle que ce sérum possédait avant l'expérience.

Le choix de la membrane a donné lieu à quelques tâtonnements : le collodion, la baudruche, le parchemin animal, modifient considérablement le *pH* des solutions : alcalinisation intense et rapide d'un côté de la paroi, acidification de l'autre. Le papier dialyseur, (papier parchemin) nous a seul paru dépourvu de ces inconvénients, et c'est lui que nous avons choisi.

Gels. — Les électrodes sont de type impolarisable : zinc dans une solution d'un sel de ce métal. Comme milieux interposés entre elles et le sérum, nous avons utilisé des gels de gélatine, de concentration suffisante pour annuler sensiblement l'osmose électrique (Gélatine purifiée de Merck à 20 %).

Neutralisation des produits d'électrolyse. — La diffusion des produits d'électrolyse est encore trop rapide à travers un gel pour qu'il soit possible de faire des expériences de longue durée. Nous avons tout d'abord tenté de ralentir leur progression en interposant un adsorbant, du charbon en poudre, entre les électrodes et la gélatine (Cf. L. GUASTALLA, ⁽¹⁴⁾). Les résultats ont été trop inconstants pour que nous puissions adopter ce dispositif, avec lequel la diffusion est parfois plus rapide que dans le gel utilisé seul, et s'accompagne d'importantes modifications de *pH* apparaissant au niveau des membranes. Nous avons

donc cherché une autre solution à cette difficulté, et laissé la gélatine en contact direct avec les électrodes et la solution de chlorure de zinc.

Or on observe dans ces conditions, que si le gel s'acidifie rapidement à l'anode, il n'y a jamais apparition, à la cathode, de zone alcaline, la soude étant neutralisée, dès sa formation, par la solution acide de chlorure de zinc. Il restait donc à constituer un système analogue pour l'électrode positive, c'est à dire à trouver un sel métallique hydrolysé, à réaction très fortement alcaline. Nous avons essayé avec succès le système zinc dans une solution de zincate de soude, que nous préparons ainsi :

A une solution saturée de ZnCl_2 , on ajoute de la lessive de soude jusqu'à précipitation complète de l'hydrate de zinc. On filtre, on lave, et on redissout dans de la lessive de soude.

Les produits d'électrolyse sont donc neutralisés dès leur formation : on n'observe en effet, ni alcalinisation de la gélatine à la cathode, ni acidification à l'anode.

Il faut, naturellement, avoir soin de mettre au contact de chaque électrode, une quantité suffisante de la solution appropriée pour que cette neutralisation soit toujours assurée.

L'invariance des pH est désormais obtenue, à condition que les solutions et les gels aient la même teneur en sel, et surtout le même pH. Cette condition est d'une réalisation parfois difficile, et c'est à cela qu'il convient d'attribuer les faibles variations que nous constatons, irrégulièrement d'ailleurs, dans nos expériences. Elles ne dépassent qu'exceptionnellement 2/10^e unité pH.

Expériences de contrôle. — Avant d'adopter le schéma expérimental que nous venons de décrire, nous nous sommes assuré que ni les gels ni les membranes ne libéraient, sous l'action du courant, des ions qui aient une action sur les propriétés spécifiques des antisérums, ou sur les réactions qui permettent de les titrer.

Nous avons donc fait, dans les conditions de durée et de champ fixées pour les expériences ultérieures, un premier essai dans lequel de l'eau physiologique était mise à la place du sérum dans le tube A de l'appareil. Les réactions d'agglutination, d'hémolyse, etc., faites en présence des fractions anodiques et cathodiques de cette eau physiologique cataphorée, étaient comparées à celles que donnent des tubes témoins.

Ces essais nous ont permis de constater que la gélatine, même purifiée, libère des ions positifs qui accélèrent l'hémolyse ; on ne peut donc la laisser, à l'anode, au contact de la solution saline qui remplit les tubes latéraux, du moins pour tout sérum dont le titrage exige l'intervention des réactions d'hémolyse, de Bordet-Gengou, ou de Bordet-Wassermann.

La membrane de papier dialyseur contient à la fois des ions positifs qui accélèrent l'hémolyse, et des ions négatifs qui fixent le complément. Le schéma que nous avons adopté pour la cataphorèse de tous ces sérums (sérums hémolytiques, syphilitiques, alexine, etc.) est donc le suivant :

Anode. — ELECTRODE : ZINC dans une solution de zincate de soude, dont l'alcalinité neutralise l'acide formé par électrolyse.

GELS : 1° Contre la solution de zincate de soude : *Gélatine Merck* à 20 % en solution chlorurée, qui empêche l'osmose et la rapide diffusion du zinc vers l'électrode négative.

2° Au-dessous de la gélatine : *Gélose Franckel* à 3 %, en solution chlorurée, destinée à arrêter les particules électropositives contenues dans la gélatine. Elle est, elle-même, dépourvue de cations nocifs.

Cathode. — ELECTRODE : ZINC dans une solution de zincate de soude, dont l'alcalinité neutralise l'acide formé par électrolyse.

GEL : *Gélatine Merck* à 20 % en solution chlorurée.

Membranes. — *Papier dialyseur*, longuement lavé ou dialysé électriquement pendant 30' à 1 heure. Cette préparation suffit à le débarrasser des substances qui gênent la réaction.

Il convient, naturellement, de faire pour tout antisérum une nouvelle expérience témoin, et de choisir, pour chacun d'eux, les systèmes de gels qui n'altèrent pas ses propriétés. Les anticorps que nous avons cataphorés sont beaucoup moins sensibles que l'hémolysine aux ions libérés par les gels et les membranes, et nous avons pu, généralement, nous contenter d'interposer de la gélatine entre les électrodes et la solution saline.

Sérum. — Le sérum est rarement utilisé pur, car la vitesse de déplacement des micelles colloïdales est faible dans un tel milieu. Nous le diluons dans une solution de NaCl à 0 gr. 5 % généralement.

Montage de l'appareil. — L'appareil est en Pyrex ou en cristal, verres neutres qui sont sans action sur la réaction des solutions.

Quelques précautions sont nécessaires pour remplir correctement l'appareil, et éviter les bulles d'air qui subsistent de chaque côté de la membrane, surtout avec un tube de faible diamètre.

Le verre doit être très soigneusement dégraissé par un séjour prolongé dans le mélange sulfochromique, puis lavé à l'eau distillée chaude. On enduit les rodages d'une couche mince et uniforme de graisse à robinets peu fusible (marque Airène-Vide). On laisse des disques de papier dialyseur séjourner dans de l'eau distillée chaude, puis on monte. On verse immédiatement les solutions dans l'appareil, avant que les membranes aient eu le temps de sécher.

Prélèvements. — Les prélèvements se font ainsi :

L'orifice anodique est fermé hermétiquement avec de la cire à modeler. On aspire la totalité du liquide cathodique. On bouche, et on prélève l'anode.

Le fond du tube en U est recueilli isolément, ou joint à l'une des deux autres fractions.

On peut ainsi, malgré l'absence de robinets qui constituent des points de chauffe considérables, séparer les diverses portions de la solution soumise à la cataphorèse.

II. — METHODES DE DOSAGE

La comparaison entre les mobilités des protéines et des anticorps constitue, comme nous l'avons dit, le principal intérêt de notre méthode d'électrophorèse. Nous allons exposer dans ce paragraphe, les techniques qui nous ont servi à les titrer.

1) **Dosage des protéines.** — Les protéines ont été dosées par néphélémétrie, après précipitation par :

- l'acide phosphotungstique ou l'acétone pour les protéines totales ;
- le sulfate d'ammonium à demi-saturation, pour les globulines.

Cette méthode est sans doute très grossière, mais les différences de mobilité que nous avons constatées entre les protéines et les anticorps n'exigeaient pas plus de précision. Les résultats sont généralement satisfaisants : les protéines qui disparaissent à l'un des pôles se retrouvent à l'autre et dans la partie médiane du tube en U central, où se concentrent, en milieu alcalin, les éléments du sérum. Cette accumulation est liée à la variation que subit la valeur du champ le long du tube à cataphorèse, (p. 11), au ralentissement que subissent les particules électronégatives en passant de la branche cathodique dans la branche anodique. Il est donc nécessaire de prélever cette fraction de liquide pour la joindre à l'une des deux autres, et de tenir compte des volumes prélevés dans chaque branche dans l'interprétation correcte d'une expérience de transport.

L'erreur ne dépasse généralement pas 3 à 5 % ; elle peut s'expliquer par une adsorption contre la paroi de verre, (considérable avec une telle surface de contact), et par une accumulation auprès des membranes, où dans certains cas, nous avons observé la présence d'un épais bouchon protéique coloré.

2) **Dosages de chlore.** — La concentration saline se modifie au cours de l'électrophorèse ; malgré des variations de pH faibles ou nulles, les solutions qui baignent les faces opposées d'une même membrane présentent, en fin d'expérience, des différences importantes dans leur teneur en sel ; en milieu de NaCl, par exemple, la branche cathodique s'appauvrit, tandis que la branche anodique s'enrichit (*). Ces modifications s'accompagnent d'une baisse dans l'intensité du courant — plus accusée en milieu alcalin qu'en milieu acide — de sorte que la valeur du champ ne reste ni constante dans le temps, ni uniforme le long du tube en U central.

Les titrages de chlore sont une mesure de ces variations ; ils nous ont donné la raison de transports anormalement rapides ou lents que nous avons parfois observés. (Exp. 1. Tableau XIII). Ils permettent aussi de titrer le sérum

(*) Avec d'autres sels, CaCl_2 , par exemple, c'est l'inverse qui se produit.

témoin, et les solutions anodique et cathodique en milieu de salinité uniforme et convenable (0 gr. 9 % de NaCl), correction surtout indispensable dans les titrages hémolytiques, et qui se fait par adjonction, à chaque liquide, d'une solution de Na Cl de titre approprié (page 18).

3) **Titration des anticorps.** — On pense communément que le titre d'un immunosérum est inversement proportionnel à la plus petite quantité qui donne une réaction complète dans des conditions définies de température et de durée.

Cette définition manque de précision : le critérium choisi — réaction complète —, acceptable pour l'hémolyse, devient purement arbitraire pour une agglutination ou une précipitation. Les titrages hémolytiques eux-mêmes ne sont pas très exacts, car ils ne tiennent pas un compte suffisant du rôle que

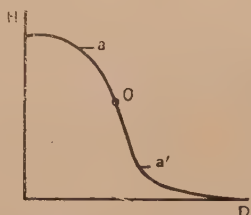


Fig. 4. — Valeur de l'hémolyse (H) en fonction de la dilution de l'antisérum (D).
O : zone de sensibilité maxima.

joue la concentration de l'anticorps dans les manifestations de son activité. Il est cependant d'observation courante que les doses d'antisérum à utiliser pour obtenir une réaction complète ne sont pas proportionnelles aux dilutions, mais que les valeurs trouvées s'écartent d'autant plus des valeurs réelles que les dilutions sont plus grandes, si bien qu'à la limite les titrages perdent toute signification.

C'est là un caractère constant des réactions d'immunité : quelles que soient les variables choisies pour les étudier, (temps d'hémolyse en fonction de la quantité d'ambocepteur ou de complément, pourcentage hémolytique en fonction du temps ou de la quantité de substance active etc.) les figures obtenues ne sont jamais des droites, mais des courbes en S. (PONDER⁽²⁴⁾ MADSEN⁽³⁵⁾ COULTER⁽³⁶⁾) (courbe 4). Il faut à la fois plus de *temps* et plus de *substance active* pour hémolyser les derniers dixièmes d'une suspension globulaire que pour hémolyser les fractions intermédiaires. C'est donc seulement dans la partie moyenne des courbes, en O, que les titrages présentent quelque exactitude ; c'est aussi dans cette zone qu'ils possèdent la plus grande sensibilité.

Des méthodes longues et compliquées, basées sur ces observations ont été proposées pour titrer les anticorps. Aucune d'elles cependant, ne supprime l'intervention de deux variables : ce sont, pour COULTER⁽³⁶⁾ par exemple, à la fois la dilution des sérums, et les doses employées.

La technique que nous avons utilisée est beaucoup plus simple, et ne comporte qu'une seule variable.

Principe. — Comme dans la méthode de COULTER, nous prenons comme terme de référence un sérum d'activité connue et stable. Ce sérum et le sérum à titrer sont portés à des dilutions telles qu'ils donnent, employés aux *mêmes doses*, et dans les mêmes conditions, *des réactions en tout point identiques*.

Si l'on prend comme unité le titre du sérum standard, ($T_{st} = 1$), le titre cherché est évidemment égal à :

$$T_x = \frac{D_{st}}{D_x}$$

D_{st} étant la dilution du sérum standard, et

D_x , la dilution du sérum à tirer

Le phénomène peut rester inachevé : le titrage n'en est pas moins possible et exact ; mais il n'est pas toujours également sensible. Un même sérum donne en effet, pour des dilutions voisines choisies ou très fortes ou très faibles, des réactions qui ne diffèrent pratiquement pas l'une de l'autre. Tantôt le phénomène est trop brutal, avec un temps de latence qui ne peut être raccourci et une évolution rapide ; tantôt, il manque de netteté, avec un début très imprécis et un achèvement très lent.

Des dilutions intermédiaires donnent, au contraire, des réactions franchement positives, qui débute à des moments différents, et s'achèvent plus ou moins vite. Ce sont ces dilutions qui mettent le mieux en valeur les faibles différences d'activité dont le titrage précis est justement nécessaire, et ce sont ces deux facteurs : début de la réaction, temps nécessaire à son achèvement, qui sont les meilleurs termes de comparaison, les plus précis et les plus fidèles.

C'est avec cette méthode que nous avons pu déterminer le point isoélectrique précis de l'anticorps, et mesurer sa vitesse de déplacement dans des régions éloignées de ce point, alors qu'on n'avait seulement jusqu'ici, défini la zone de pH , toujours étendue et mal délimitée, où son transport paraissait sensiblement nul.

Technique. — Le titrage se fait en plusieurs séries de 5 tubes, contenant des quantités *croissantes de sérum* : 0 cc. 1 à 0 cc. 5 en général, des *quantités constantes* d'antigène, et, s'il y a lieu, de complément.

Une première série est réservée au sérum à titrer, dilué de telle sorte que la réaction soit positive dans le dernier tube, et encore négative dans le premier, au bout de 20 à 25' d'étuve. (Zone de sensibilité maxima).

Cette série est comparée à *chacune des séries suivantes*, toutes destinées au sérum standard, utilisé aux mêmes doses (0 cc. 1 à 0 cc. 5), mais porté à des dilutions diverses, qui diffèrent entre elles de 1/10.

On porte à l'étuve à 37°, et on suit la marche de la réaction, par des lectures faites toutes les 10'.

La lecture directe ne nuit pas à la sensibilité du titrage, car ce ne sont pas des différences *quantitatives* que l'œil doit apprécier, mais bien une *identité* dans la valeur de la réaction. Cette identité doit se retrouver au cours des lectures successives et entre *chacun* des tubes qui se correspondent dans les deux séries dont on établira finalement l'identité.

Dans nos expériences, ce sont les liquides prélevés à l'anode et à la cathode qui sont comparés au sérum originel, tel qu'il a été dilué pour la cataphorèse.

Pour simplifier, nous désignerons par T, A, et C, ces solutions ramenées au titre de 0 gr. 9 % de NaCl par adjonction de volumes égaux de solution de titre approprié.

C'est donc la solution T qui est utilisée pour faire les échelles de dilutions auxquelles A et C seront comparés. Nous donnons ici à titre d'exemple, la détermination quantitative d'un transport d'hémolysine dans une de nos expériences d'électrophorèse.

Conditions d'expérience.

Dilution du sérum	1/30 dans NaCl à 0 gr. 5 %
pH.	7.08
Champ	25 volts par cm.
Durée	6 heures

Un essai préalable a montré que la dilution favorable pour le titrage de ce sérum est de 1/360^e. (Zône de sensibilité maxima).

Les dosages de Cl ayant donné :

pour le sérum témoin	0 gr. 5 % de NaCl
pour l'anode	0 gr. 6
pour la cathode	0 gr. 25

on ramène à 0 gr. 9 % en ajoutant des volumes égaux des solutions suivantes :

pour le sérum témoin	1 gr. 3 % de NaCl
pour l'anode	1 gr. 2
pour la cathode	1 gr. 55

La dilution est portée par cette opération à 1/60^e, et ce sont ces solutions que nous désignons par les lettres T, A et C.

Titrage qualitatif. — Un premier essai, fait pour connaître le sens et la valeur approximative du transport, donne :

Un *accroissement* d'activité à l'*anode*, qui hémolyse plus précocement et plus vite que le témoin, une *diminution* à la *cathode*.

Pour cet essai, T, A, C, dilués 6 fois avec de l'eau physiologique, sont utilisés aux doses de 0 cc. 1 à 0 cc. 5. On ajoute à chaque tube :

Alexine (sérum de cobaye à 1/10 ^e)	0 cc. 2
Suspension globulaire (à 1/20)	0 cc. 2

On complète à 1 cc. 2 le volume de chaque tube, on porte à l'étuve à 37°, et on suit la marche de la réaction.

Titrage quantitatif. — A va être comparé à des solutions plus concentrées que T, et C, à des solutions plus diluées.

Nous donnons dans le tableau suivant, la manière dont nous préparons ces dilutions, en y joignant le détail du titrage et de la lecture.

Préparation des dilutions témoins		Hémolyse ⁽¹⁾		
	Volume des solutions		Lectures faites au bout de :	
	T	NaCl 0,9%	15'	30'
1° Accroissement de concentration de :				
1/10 (T dilué à $\frac{1,1}{6}$).....	1 cc.	4 cc. 9	H0. H0. H0. H2. H4	H0. H1. H3. H7. H8
2/10 (T dilué à $\frac{1,2}{6}$).....	1. cc. 2	4 cc. 8	H0. H0. H1. H3. H6	H1. H4. H6. H8. H8.
3/10 (T dilué à $\frac{1,3}{6}$).....	1 cc. 3	4 cc. 7	H0. H1. H5. H8. H8	H5. H8. H8. H8. H8
Anode (A dilué à $\frac{1}{6}$).....			H0. H0. H1. H3. H6	H1. H4. H6. H8. H8
2° Diminution de concentration de :				
1/10 (T dilué à $\frac{0,9}{6}$).....	0 cc. 9	5 cc. 1	H0. H0. H0. H0. H1	H0. H0. H1. H4. H7
2/10 (T dilué à $\frac{0,8}{6}$).....	0 cc. 8	5 cc. 2	H0. H0. H0. H0. H0	H0. H0. H0. H1. H3
3/10 (T dilué à $\frac{0,7}{6}$).....	0 cc. 7	5 cc. 3	H0. H0. H0. H0. H0	H0. H0. H0. H0. H1
Cathode (C dilué à $\frac{1}{6}$).....			H0. H0. H0. H0. H0	H0. H0. H0. H1. H3
Contrôle (T dilué à $\frac{1}{6}$).....	1 cc.	5 cc.	H0. H0. H0. H1. H3	H0. H0. H2. H5. H8

La comparaison de A avec le premier groupe de dilutions montre que l'hémolyse se produit d'une manière identique dans A dilué à $\frac{1}{6}$, et dans T dilué à $\frac{1,2}{6}$. Cette égalité se retrouve entre chaque tube des deux séries, au cours de l'évolution de la réaction, dont nous n'avons ici donné que deux étapes.

De même, la comparaison de C avec le deuxième groupe de dilutions établit l'égalité de C dilué à $\frac{1}{6}$ et de T dilué à $\frac{0,8}{6}$.

On peut donc conclure que 20 % de l'hémolysine contenue dans le sérum originel ont disparu du liquide cathodique, et se sont transportés vers l'anode, où on les retrouve intégralement.

NOTE : Lorsque le transport dépasse 20 %, il vaut mieux employer une dilution différente pour titrer chaque pôle : $\frac{1}{3}$, par exemple pour la cathode, $\frac{1}{6}$, pour l'anode. Les échelles de témoins sont alors préparés avec T/3 pour la cathode et T/6 pour l'anode. Chaque mesure se fait ainsi dans la même zone de sensibilité.

(1) Dans ces tableaux, H0 signifie hémolyse nulle
H8 signifie hémolyse totale.

Conclusion. — Malgré leur exactitude, ces titrages sont d'inégale valeur. Seule, la réaction d'hémolyse permet de lire des déplacements de 5 % (*) ; l'agglutination microbienne, (agglutination flagellaire), moins sensible, donne encore de bons résultats, (10 %) avec des sérums très actifs, à réaction rapide et nette. Par contre, l'hémoagglutination, ou l'agglutination microbienne somatique, se prêtent mal à des titrages quantitatifs, deux dilutions d'un même sérum différant de 20 et même 30 %, donnant parfois des réactions à peu près comparables. Toutefois, il existe, pour chaque sérum, une zone très limitée de sensibilité maxima, un moment parfois fugace où une différence apparaît. Ces conditions favorables ne sont pas toujours aisées à déterminer, mais comme notre procédé donne, avec les échelles de témoins, la sensibilité particulière que présente chaque mesure, nous avons pu éviter d'interpréter comme une absence de transport l'impossibilité où nous étions de le déceler. (Hémoagglutinines naturelles par exemple, dont l'activité est toujours très faible, les titrages peu sensibles et les déplacements très lents, puisque la cataphorèse se fait avec du sérum pur ou faiblement dilué).

Ces remarques s'appliquent uniquement à la comparaison de dilutions diverses d'un même sérum. Nous n'avons pas cherché le moyen de tirer comparativement des sérums différents, ni défini l'unité « anticorps » qui servirait de commune mesure à leur activité. Ce problème n'est pas seulement plus complexe, il est, selon nous, tout à fait différent.

Si la cataphorèse ne fait subir *aucune* altération à l'activité des immunosérums, et si la comparaison des liquides anodique et cathodique ne porte que sur des différences de concentration de la même substance, il n'est pas certain qu'il en soit encore ainsi lorsqu'on passe d'un sérum à un autre. L'aspect particulier que revêtent, avec chacun d'eux, les réactions spécifiques, semble, au contraire, ne pas traduire seulement des différences quantitatives.

A cet égard, les modifications que subit un immunosérum en vieillissant sont très instructives : son titre baisse, tandis que la réaction perd ses caractères primitifs : elle devient moins nette, deux doses voisines donnent, à toutes dilutions, des différences moins tranchées, et les titrages quantitatifs perdent leur précision. La comparaison d'un sérum frais et du même sérum vieilli comporte donc une part d'arbitraire considérable : il n'est pas vraisemblable que l'anticorps se soit détruit en partie ; il est plus rationnel de penser qu'il a subi des modifications de structure qui retentissent sur son activité.

Dans un travail récent, EAGLE, SMITH et VICKERS (27) aboutissent à des conclusions analogues. La diazotation affaiblit le pouvoir flocculant de l'antitoxine, qui finit par disparaître lorsque le traitement se prolonge. Cependant le rapport Toxine/Antitoxine qui, produisant la floculation maxima, définit le titre de l'antitoxine, *reste le même au cours de l'affaiblissement progressif que présente la réaction de floculation*. Il semble donc n'y avoir aucun rapport entre le titre d'une antitoxine, et son *pouvoir flocculant*.

(*) Ce qui donne une différence de 10 % entre les deux pôles, dont l'un est titré par rapport à l'autre.

DEUXIÈME PARTIE

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I

SÉRUMS ANTIGLOBULAIRES

PREMIÈRE PARTIE

C'est avec des sérums hémolytiques que nous avons mis au point notre technique, et fait le plus grand nombre d'expériences. L'hémolyse étant, en effet, d'une lecture plus aisée, d'un titrage plus précis que toute autre réaction d'immunité, permet seule de déceler les faibles déplacements de l'anticorps dans la zone de pH avoisinant son point isoélectrique.

La sensibilité du titrage n'est pas la seule raison de notre choix : la possibilité d'effectuer, en même temps qu'une hémolyse, les réactions d'agglutination et de fixation du complément, permettait, en comparant sur un même anti-sérum le déplacement de ces diverses propriétés, de savoir s'il est vraiment indispensable de supposer, pour chacune d'elles, un support matériel distinct.

1) **Historique.** — TEAGUE et BUXTON (¹⁰) sont les seuls auteurs qui aient tenté l'électrophorèse des sérums hémolytiques. Ils expérimentèrent sur des sérums frais, sans dissocier les deux éléments — sensibilisatrice et alexine — qui interviennent dans une hémolyse. Leurs résultats furent négatifs : la réaction ne se produisait plus avec le sérum cataphoré, ni avec l'eau de macération des arcs de gélose anodique et cathodique (fig. 1). Ils reconnurent bientôt que la fixation du complément par la gélose était la cause de cet échec, et cataphorèrent, dès lors, des sérums inactivés par chauffage à 56°. Ils observèrent dans ces nouvelles conditions, un transport de l'hémolysine *vers la cathode* (la réaction des sérums étant maintenue au voisinage de la neutralité).

Nous avons ailleurs dénoncé le vice fondamental de la technique employée par FIELD, TEAGUE et BUXTON. Il n'y a donc pas lieu de retenir leurs résultats (page 6).

2) **Recherches personnelles.** — Nous avons repris, dans les conditions déjà décrites, l'électrophorèse des sérums anti-globulaires.

Sérums. — Nous avons expérimenté soit sur du sérum de *cheval* et de *lapin anti-mouton*, soit sur du sérum de *lapin anti-bœuf*, préparés selon le procédé classique. (Injections intra-veineuses d'une suspension dans l'eau physiologique

d'hématies préalablement lavées). Ces sérums, inactivés par chauffage à 56°, furent dilués, pour la cataphorèse, dans des solutions de NaCl.

Titrages. — L'anticorps a été titré par la méthode générale décrite page 15, généralement au moyen de la réaction d'hémolyse, parfois aussi, à titre de contrôle, par l'hémoagglutination ou la réaction de fixation du complément. L'antigène utilisé dans ce cas est un extrait aqueux de stromas globulaires préparé de la manière suivante :

10 cc. d'hématies de mouton, préalablement lavées, sont laquées dans de l'eau distillée. On centrifuge, et le culot est redissout dans quelques gouttes de NaOH à N/20, auxquelles on ajoute 5 cc. d'eau physiologique.

Cet antigène ne fixe pas spontanément le complément ; nous l'utilisons à la dose de 0 cc. 2.

Comme groupe hémolytique, nous avons choisi des globules de bœuf et du sérum anti-bœuf ; comme alexine, du sérum de cobaye, frais ou conservé selon le procédé de Ronchèse.

Résultats. — Nous ne pouvons publier ici la liste complète de nos expériences (plus de 100 sur les seuls sérums hémolytiques). Celles que nous donnons dans les tableaux I à VI, ont été confirmées par de nombreux essais dont nous pouvons ainsi brièvement résumer les résultats :

En milieu alcalin, et jusqu'à p H 6,3 le liquide anodique hémolyse, agglutine, fixe mieux le complément que le sérum témoin. Dans le liquide cathodique, ces trois réactions sont affaiblies.

En milieu acide, de p H 4,5 à p H 6,2, au contraire, c'est à la cathode qu'on observe un accroissement d'activité, et à l'anode, un affaiblissement.

A p H 6,2/6,3, il est impossible de noter une différence entre l'activité du sérum témoin, et celle des portions anodique et cathodique. —

Remarques. — 1° Les effets produits par le passage du courant sont indépendants de l'âge du sérum, de sa nature (lapin ou cheval), de sa dilution, que nous avons fait varier de 1/5^e à 1/100^e, de la nature de l'anticorps (anti-mouton ou anti-bœuf).

2° Pour un p H donné, ils croissent avec le *temps* de passage du courant, et la *valeur du champ* utilisé. Le tableau I, où nous avons groupé trois séries d'expériences faites avec des voltages croissants (2 à 30 volts cm) montre que :

A p H 7 (exp. 1 à 5), des champs inférieurs à 5 volts cm. ne modifient pas d'une manière sensible le pouvoir hémolytique du sérum. Il faut atteindre 10 volts cm. pour que l'accroissement d'activité du liquide anodique puisse être titré (10 %) et 20 volts cm. pour qu'il atteigne une valeur de 20 % (Exp. 6 à 8).

Cependant une quantité importante de protéines s'est déplacée vers l'anode (50 et 75 %).

A p H 8,4, comme à p H 5,4, des effets analogues peuvent être constatés. (Exp. 9 à 13 et 14 à 17).

3° Un accroissement d'activité compense quantitativement à l'un des pôles. l'affaiblissement subi par l'autre. (Cf. p. 15, l'exemple donné pour le titrage des anticorps).

Il y a donc bien transport dans un champ électrique, de l'anticorps hémolytique, et le *sens* de ce transport ne dépend, dans les conditions choisies, que du *p H du milieu*.

4° L'observation suivante confirme cette conclusion : toutes les réactions

que nous avons utilisées pour titrer l'anticorps (hémolyse, agglutination, fixation du complément), donnent des valeurs identiques aux accroissements et aux diminutions d'activité constatés à l'un et à l'autre pôle. (Tableau IV).

L'accord des réactions d'hémolyse et de Bordet-Gengou est d'une importance particulière; il élimine toute possibilité de perturbations accidentelles du sérum cataphoré: apport de substances étrangères qui affecteraient l'hémolyse, modification du sérum lui-même qui acquerrait ou perdrait des propriétés anti-complémentaires. (Cf. *sérum syphilitique*, p. 46).

La réaction de fixation du complément permet d'ailleurs de s'assurer que les liquides prélevés à l'anode et à la cathode, pas plus que le sérum témoin, ne

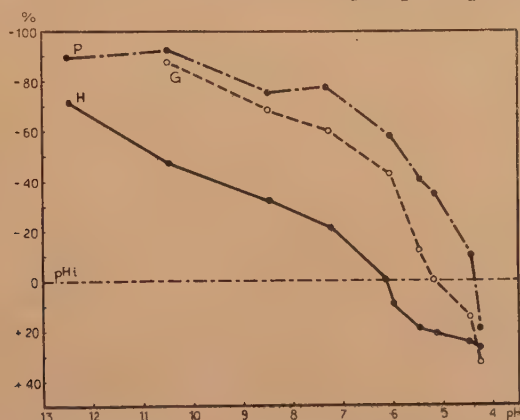


Fig. 5. — Valeurs comparatives, en fonction du pH, du déplacement des

Protéines totales (P)
Globulines (G)
Hémolysine (H)

chiffre en % de substance transportée.

Le signe — indique un déplacement vers l'anode; le signe + un déplacement vers la cathode.

possèdent d'action propre sur le système hémolytique utilisé: les différences n'apparaissent qu'en présence d'antigène; elles sont donc liées à l'anticorps seul, à son déplacement dans le champ.

5° Pour une durée d'expérience et un champ constants, le transport de l'anticorps est nul à un pH de 6,2/6,3 environ. (Tableau II. Exp. 2 à 8); de chaque côté de ce point, il prend des valeurs opposées, et croissantes à mesure qu'on s'en éloigne.

Nous avons réuni dans le tableau III les chiffres obtenus dans des expériences faites à des pH variés, avec un voltage de 1.500 volts aux bornes, et une durée de 5 h. 30'. Ces chiffres, reportés sur le graphique 5, montrent que:

a) de part d'autre de pH 6,3, la vitesse de l'anticorps prend des valeurs sensiblement égales, mais de signe opposé.

b) Ces valeurs croissent régulièrement à mesure qu'on s'éloigne de ce point; dans la zone acide, un maximum n'a pu être atteint. Mais l'électrophorèse des sérums hémolytiques n'est plus possible au-dessous de pH 4,5, car si l'activité du sérum témoin est encore conservée, même sans des milieux plus acides, (pH 4) les liquides anodique et cathodique ne donnent plus qu'une hémolyse faible ou nulle. En milieu alcalin, nous avons atteint un pH de 12,5, sans trouver un maximum à l'accroissement d'activité du liquide anodique.

c) Ces valeurs sont notablement inférieures à celles que possèdent, dans les mêmes conditions, les protéines de l'antisérum : albumines et globulines. (Courbe 5).

Discussion. — L'anticorps hémolytique est donc un *ampholyte*, de faible densité de charge, de point isoélectrique égal à 6,2/6,3. C'est en effet cette valeur que nous trouvons dans les expériences où les modifications de pH ont été parti-

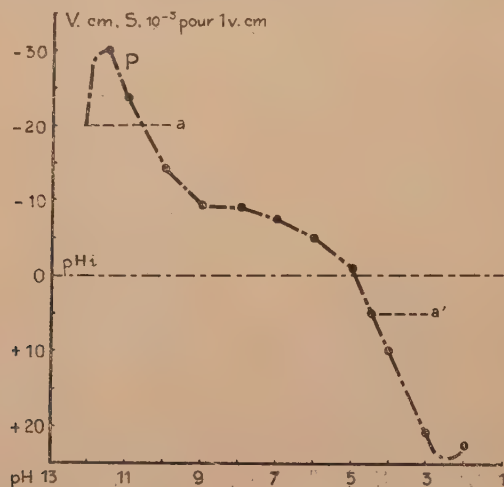


Fig. 6. — Vitesse de déplacement de la sérum albumine d'après KÖNIG et PAULI. Les points a et a' correspondent aux zones de pH étudiées dans la courbe 5.

culièrement réduites. (Tableau II, Exp. 2 à 8). Pour des pH très voisins, une différence déjà sensible existe entre l'activité des liquides recueillis aux deux pôles ; c'est donc un point, et non un zone isoélectrique que nous avons pu définir.

Le déplacement des protéines est un contrôle de la valeur de ces mesures.

1° Leur point isoélectrique n'a jamais été mesuré dans le sérum lui-même, mais après isolement et purification, et souvent, d'ailleurs, dans des conditions défec- tueuses. En somme, il reste peu de résultats corrects ; citons ceux de SÖRENSEN ⁽²⁸⁾ de TISELIUS ⁽²⁹⁾ de KÖNIG et PAULI ⁽³⁰⁾ sur la sérum albumine. Un pH de 4,9 est attribué aux solutions pures de ce corps, et un pH de 4,7 à son point isoélec- trique.

Nous n'avons pu doser l'albumine seule, les volumes prélevés dans nos essais étant trop petits, (2 cc. 5 à chaque pôle), et la dilution du sérum trop grande. Mais c'est vers pH 4,9, que l'acide phosphotungstique (qui précipite la totalité des protéines), donne un trouble identique à l'anode et à la cathode. Et comme la sérum globuline est déjà électropositive à ce pH, nous retrouvons, en définitive, une valeur voisine de 4,7, comme point isoélectrique de la sérum albumine.

Pour la sérum globuline, les résultats varient avec le procédé choisi pour la précipiter. Un point isoélectrique de 5,2/5,4 est généralement attribué à l'e-

globuline, que ce point soit déterminé par des méthodes de floculation ou par électrophorèse ; (KREBS⁽³¹⁾ MICHAELIS et RONA⁽³²⁾ HOWITT et PRIDAUX⁽³³⁾).

Pour la pseudo-globuline, cataphorée en présence des seuls ions monovalents Cl et Na, KÖNIG et PAULI⁽³⁰⁾ donnent un chiffre beaucoup plus élevé, aux environs de pH 6.

Le corps présent dans le sérum n'est ni l'eu ni la pseudo-globuline, mais une substance mère dont l'une et l'autre dériveraient par transformations irréversibles. Elle diffère de la sérum albumine par sa grosseur moléculaire et son instabilité (SVEDBERG⁽³⁴⁾) ; *elle est précipitée totalement, dans du sérum dilué, par le sulfate d'ammonium à demi saturation* (Mac FARLANE et SVEDBERG^(33 et 35)), cette précipitation s'accompagnant d'une transformation irréversible.

C'est cette substance mère qui se transporte dans nos expériences et que nous titrons. (Cf. p. 14). Nous trouvons, pour son point isoélectrique, un pH inférieur de 1 unité à celui de l'anticorps : 5,2/5,3.

2° *La vitesse* des protéines est très supérieure à celle que possède, dans les mêmes conditions, l'anticorps hémolytique. (Courbe 5). Dans la courbe 6, nous avons reproduit les *vitesse absolues* de la sérum albumine, cataphorée à des pH variés, en solution pure, par KÖNIG et PAULI⁽³⁰⁾. La méthode de ces auteurs est évidemment d'une rigueur à laquelle nous ne saurions prétendre ; notre courbe est établie non avec des vitesses absolues, mais avec des vitesses moyennes apparentes, chiffrées en pourcentage de substance transportée. Nos résultats concordent cependant ; nous retrouvons, en particulier, le plateau signalé par ces auteurs entre pH 7 et pH 9.

La vitesse de la sérum globuline est toujours un peu inférieure à celle de la sérum albumine ; celle de l'anticorps, moindre encore. Elle croît régulièrement et sans palier de pH 6,2 à pH 12,5.

C'est donc par deux caractères : point isoélectrique, vitesse dans le champ, que l'hémolysine se distingue des protéines : sérum albumine, globuline originelle, eu et pseudo-globuline.

Ces deux caractères sont conservés au cours de diverses purifications que nous avons fait subir au sérum : dialyse, traitement par le sulfate d'ammonium à demi saturation, qui cependant entraînent des transformations irréversibles des globulines. (Tableaux V et V bis).

A. DIALYSE.

Du sérum anti-mouton est dilué à 1/10 avec de l'eau distillée, et acidifié ; une partie des globulines flocule. On centrifuge, et on dialyse à la glacière pendant 8 à 10 jours. On élimine le précipité formé par agitation avec de petites quantités de kaolin, et centrifugation rapide.

On recueille un liquide clair, qui ne précipite plus avec NaCl saturé, et ne donne avec SO_4Am^2 à demi saturation qu'un précipité peu abondant. L'anticorps conserve dans ce liquide son point isoélectrique et sa même vitesse par rapport aux protéines. (Tableau V).

B. SULFATE D'AMMONIUM.

On précipite les globulines par du sulfate d'ammonium à demi saturation, et on dialyse à la glacière, jusqu'à disparition de traces de S. On redissout dans une solution de NaCl à 0 gr. 7 %.

L'hémolysine se transporte, dans ce milieu, comme dans du sérum total. (Tableau V bis.)

Electrophorèse des sérums hémolytiques

TABLEAU I. — *Vitesse de déplacement en fonction du champ utilisé*

Conditions générales : Sérum de cheval anti-mouton, dilué pour la cataporèse à 1/30 dans une solution de NaCl à 0 gr. 5 %. Durée 6 heures. Titrages hémolytiques (1).

Exp. n°	Voltage	Protéines totales	Hémolyse
<i>Première série : pH voisin de 7</i>			
1	4 v,cm	»	Témoin H0.H1.H3.H7.H8 Transport à peine lisible Anode H0.H1.H4.H7.H8 Cathode H0.H1.H3.H6.H8
2	8 v,cm	45 % vers +	Les trois expériences donnent un transport net vers l'anode, légèrement inférieur à 10 %.
3	»	50 % vers +	
4	»	50 % vers +	
5	10 v,cm	52 % vers +	10 % vers +
6	20 v,cm	68 % vers +	Un peu inférieur à 20 % vers (+)
7	»	70 % vers +	Un peu inférieur à 20 % vers (+)
8	»	75 % vers +	20 % vers (+)
<i>Deuxième série : pH voisin de 8</i>			
9	20 v,cm	66 % vers +	25 % vers (+)
10	»	65 % vers +	25 % vers (+)
11	30 v,cm	80 % vers +	30 à 35 % vers (+)
12	»	83 % vers +	30 à 35 % vers (+)
13	»	85 % vers +	35 % vers (+)
<i>Troisième série : pH voisin de 5,4</i>			
14	20 v,cm	48 % vers +	20 % vers (—)
15	»	50 % vers +	20 % vers (—)
16	30 v cm	55 % vers +	20 à 25 % vers (—)
17	»	60 % vers +	25 % vers (—)

TABLEAU II. — *Point isoélectrique*

Conditions générales : Sérum de cheval anti-mouton, dilué à 1/30 dans NaCl à 0 gr. 5 %.
Durée 6 heures.

Exp. n°	Voltage	pH	Protéines totales	Globulines	Hémolysine
1	22 v, cm	6,5	55 % vers +	40 % vers +	5 à 10 % vers +
2	20 v, cm	6,3	50 % vers +	38 % vers +	Les quatre expériences donnent un très faible déplacement vers l'anode inférieur à 5 %.
3	30 »		62 % vers +		
4	30 »		66 % vers +		
5	35 »		70 % vers +	60 % vers +	
6	25 v, cm	6,2	60 % vers +	40 % vers +	Les trois expériences donnent un très faible déplacement vers la cathode inférieur à 5 %.
7	30 »		66 % vers +		
8	40 »		75 % vers +		
9	30 v, cm	6,1	58 % vers +	43 % vers +	10 % vers (—)
10	25 v, cm	5,9	50 % vers +	30/35 % vers +	Voisin de 10 % vers (—)

(1) Dans tous ces tableaux : (+) signifie pôle positif ; (—) pôle négatif.

TABLEAU III. — *Vitesse de déplacement en fonction du pH*

Conditions générales : Sérum de cheval anti-mouton, dilué à 1/40 dans une solution de NaCl à 0 gr. 5 %. Durée 5 h. 30. Tension aux bornes 1.500 volts. Titrages hémolytiques.

Exp. n°	pH	Protéines totales	Globulines	Hémolysine
1	4,6	20 % vers —	33 % vers —	25 à 30 % vers —
2	4,9	10 % vers +	15 % vers —	25 % vers —
3	5,2	35 % vers +	pas de déplacement	20 à 25 % vers —
4	5,5	40 % vers +	12 % vers +	20 % vers —
5	6,4	58 % vers +	43 % vers +	10 % vers — (un peu inf.)
6	7,3	78 % vers +	60 % vers +	20 % vers + (un peu sup.)
7	8,5	75 % vers +	69 % vers +	30 à 35 % vers +
8	10,5	90 à 95 % vers +	85 à 90 % vers —	45 à 50 % vers +
9	12 à 12,5	95 % vers +		70 à 75 % vers +
10	»	90 % vers +		Très légèrement supérieur à 70 % vers +

TABLEAU IV. — *Comparaison des réactions d'hémolyse, d'agglutination et de Bordet-Gengou (fixation du complément) utilisées pour titrer le déplacement de l'anticorps dans une expérience d'électrophorèse.*

Conditions générales : Sérum de cheval anti-mouton, dilué à 1/30 dans une solution de NaCl à 0 gr. 5 %.

pH	Protéines totales	Globulines	Anticorps
5,6	50 % vers +	20 % vers +	Les trois réactions donnent un transport un peu inférieur à 20 % vers la cathode.
6,3	66 % vers +		Les trois réactions ont des valeurs sensiblement égales dans le sérum témoin, et les solutions anodique et cathodique.

TABLEAU V. — *Transport de l'anticorps dans du sérum total, et dans du sérum débarrassé par dialyse des eu-globulines*

Exp. n°	Nature du sérum	NaCl %	pH	durée	Voltage	Protéines	Globulines	Anticorps
1	Sérum total	0 gr. 4	8,4	6 h.	30 v. cm.	90 % vers +	85 % vers +	40 % (+)
2	Sérum dialysé	0 gr. 4	»	»	»	86 % vers +		40 % (+)
3	Sérum total	0 gr. 5	5,4	6 h.	30 v. cm.	47 % vers +	18 % vers +	20 % (—)
4	Sérum dialysé	0 gr. 4	»	»	»	50 % vers +	20 % vers +	20 % (—)
5	Sérum total	0 gr. 4	5	6 h.	30 v. cm.	25 % vers +	20 % vers —	25 % (—)
6	Sérum dialysé	0 gr. 4	5	»	»	30 % vers +	20 % vers —	25 % (—)
7	Sérum dialysé	0 gr. 3	6,2/6,3	4h.	35 v. cm.	80 % vers +	50 % vers +	Sensiblement nul

TABLEAU V bis. — Point isoélectrique de l'anticorps précipité par SO_4Am^2 à demi saturation, après dialyse, et dissolution dans NaCl à 0 gr 7⁰/₀.

Exp. n°	pH	Voltage	Durée	Globulines	Anticorps
1	5,2	25 v. cm.	6 h.	pas de transport	un peu moins de 20 % vers (←)
2	6,3	25 v. cm.	6 h.	40 % vers (+)	très faible vers (+)
3	6,2	25 v. cm.	6 h.	50 % vers (+)	très faible vers (—)

Conclusion. — Ainsi donc :

1^o L'anticorps hémolytique diffère de la sérum albumine et de la sérum globuline à la fois par son point isoélectrique et par sa densité de charge.

2^o Nous n'avons pu distinguer entre-elles les différentes propriétés anti qui coexistent dans un sérum anti globulaire : il est possible qu'elles puissent être rattachées au même grain de matière, ou qu'elles appartiennent à des substances voisines, dont nous n'avons pu mettre en évidence les caractères distinctifs.

SÉRUM ANTI GLOBULAIRES, DEUXIÈME PARTIE

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons cherché à analyser le

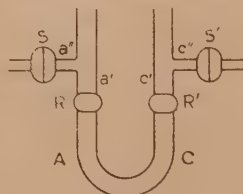


Fig. 7. — R et R' robinets.

rôle que jouent l'osmose électrique et le reflux hydrostatique dans notre dispositif expérimental.

Dans ce but, nous avons ajouté à notre appareil deux robinets, qui divisent le tube central en trois compartiments. Le sérum occupe le fond du tube, en A et C, et les titrages se font après cataphorèse, dans la solution saline qui remplit les compartiments anodiques a' et c' , et les compartiments cathodiques c'' et c'' (fig. 7).

Mise en marche et prélèvements.

Le montage se fait comme précédemment. (Page 11). Le sérum est versé au moyen d'une pipette effilée dans le fond du tube, et jusqu'au dessus de la voie des robinets. On ferme les robinets, on lave a' et c' avec de l'eau alcaline d'abord, puis avec de l'eau distillée, enfin avec la solution saline qui doit servir pour l'expérience. On ouvre les robinets, et on fait immédiatement passer le courant, pour éviter la diffusion.

Pour faire les prélèvements, on aspire d'abord a' et c' ; on lave avec de l'eau alcaline, puis distillée, avant de prélever a'' et c'' . On aspire enfin A et C, en n'ouvrant qu'un seul des deux robinets.

Résultats expérimentaux. — Nous avons réuni dans la figure 8 les résultats de trois expériences faites aux pH 8,4, 6 et 5,4. Ces courbes ont été établies de la manière suivante ; on porte en abscisse, de chaque côté d'un point central, O, représentant le centre de l'appareil, les longueurs A et C, a' et a'' c' et c'' , correspondant aux diverses parties des branches anodique et cathodique ; en ordonnée, les taux de protéines et d'anticorps trouvés après

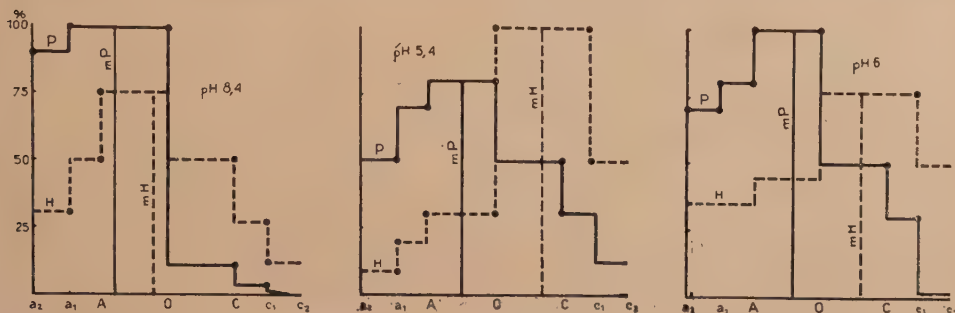


Fig. 8. — Transport des protéines (P) et de l'hémolysine (H) dans l'appareil représenté dans la figure 7 aux pH 8,4, 5,4 et 6.

cataphorèse, dans les compartiments correspondants, le titre initial du sérum étant pris comme unité.

En milieu alcalin (pH 8,4) protéines et anticorps se transportent vers l'anode, avec leur vitesse respective. La valeur et la position dans le tube en U de leur concentration maxima M_p et M_h , n'est en effet pas la même : pour les protéines, elle est située en a' et a'' , très près de la membrane anodique ; pour l'hémolysine, elle est en A seulement.

A pH 5,4, le titre de l'hémolysine présente un maximum en C et c' ; il est encore très élevé en c'' (50 % du taux initial). L'anticorps se déplace donc nettement vers la cathode.

Les protéines sont encore *électronégatives* ; mais leur charge étant plus faible qu'à pH 8,4, leur concentration maxima n'est plus en a' et a'' , mais en A seulement.

Nous retrouvons donc, dans leurs grandes lignes, les résultats précédents.

Mais la mesure des phénomènes que nous voulons étudier (osmose et reflux) est donnée par les taux de protéines et d'anticorps qui se trouvent au pôle opposé à celui où se fait le transport.

Les molécules qui se trouvent ainsi transportées sont en effet celles que l'osmose électrique a entraînées et que le reflux hydrostatique n'a pas ramenées en sens inverse (ou vice versa).

Dans une section transversale du tube en U, osmose et reflux s'exercent également sur toutes les particules de la solution, avec une force dont la valeur et le sens varient à chaque niveau. En l'absence de charge électrique, toutes les particules devraient se retrouver, en fin d'expérience, avec des taux identiques, à la fois dans les compartiments anodiques et dans les compartiments

cathodiques. Mais lorsqu'elles sont chargées, cette nouvelle force s'ajoute ou s'oppose à celle de l'osmose ou du reflux, et c'est leur somme algébrique qui donne, à chaque niveau de la section transversale, la vitesse réelle de chaque grain.

Ainsi, à pH 8,4, protéines et anticorps se déplacent vers l'anode. L'hémolyse, dont la charge est plus faible, est entraînée avec plus de rapidité par le courant osmotique vers la cathode, ramenée, au contraire, plus lentement en sens inverse, par le reflux hydrostatique.

Elle se concentre donc en c' et c'' , où on la retrouve à des taux très élevés, (ils sont respectivement de 1/5 et 1/15 dans la courbe 8), tandis que la concentration des protéines y est toujours très faible. En c' , l'acide phosphotungstique ne donne en général qu'un léger trouble ; en c'' , un louche à peine visible, qui demande parfois 24 heures pour devenir apparent. Dans quelques expériences, ce liquide est resté parfaitement limpide, même au bout de plusieurs jours. (Tableaux VI, exp. 2 et 5).

Électrophorèse de sérums hémolytiques

TABLEAU VI. — *Transport des protéines et de l'anticorps hémolytique, cataphorés en milieu alcalin dans l'appareil à robinets*

Conditions générales : Sérum dilué à 1/5^e dans NaCl à 0 gr. 5 %

Voltage : 20 v cm. Durée : 5 à 6 heures.

Exp. n°	pH	Protéines (Acide phosphotungstique)	Anticorps
1	8	c' : trouble léger c'' : pas de précipité le jour même. Louche très faible le lendemain	c' : 1/10 du taux initial c'' : 1/40 du taux initial
2	8	c' : louche c'' : Rien même le lendemain	c' : 1/10 du taux initial c'' : 1/15 du taux initial
3	8,3	c' : 1/20 du taux initial c'' : 1/200 du taux initial	c' : 1/6 du taux initial c'' : 1/10 du taux initial
4	8,4	c' : 1/30 du taux initial c'' : 1/300 du taux initial	c' : 1/8 du taux initial c'' : 1/12 du taux initial
5	8,65	$c' + c''$ Rien même le lendemain	Hémolyse rapide, non titrée

Lorsqu'on cataphore à des pH plus acides, la charge des protéines diminue ; l'osmose électrique entraîne vers la cathode des particules de plus en plus nombreuses, et à un pH de 5,4, les taux de protéines retrouvés en c' et c'' sont comparables aux taux d'anticorps transportés à pH 8,4 dans les mêmes compartiments. (Courbe 8).

Conclusion. — Ces expériences confirment donc les faits que nous avons exposés dans le précédent paragraphe ; elles mettent particulièrement bien en valeur la faible densité de charge de l'anticorps, qui, au même titre que son point isoélectrique, peut servir à l'individualiser.

Sur ce caractère peut être fondée une méthode de purification de l'anticorps.

II

SÉRUMS AGGLUTINANTS

Ce sont surtout des sérums agglutinants qui ont servi à étudier le comportement des anticorps dans un champ électrique. Il existe, sur ce sujet, un assez grand nombre de données expérimentales, mais leur diversité, leur incohérence même, sont frappantes. Certains auteurs considèrent que les agglutinines sont chargées positivement ; pour d'autres, au contraire, elles seraient électronégatives à tous les pH . Le plus souvent, cependant, on s'accorde à leur reconnaître un caractère amphotère, mais leur point isoélectrique a été situé à des pH variés, compris entre pH 4 et pH 5,7.

Comme ces déterminations ne s'accompagnent, en général, ni d'un examen critique des résultats antérieurs, ni d'une justification de la technique utilisée pour les obtenir, il n'est guère possible de porter sur elles un jugement objectif ; nous ne pourrions donc examiner chaque mémoire en particulier ; nous ne retiendrons que les plus significatifs, ceux de MICHAELIS surtout, qui font encore autorité ⁽¹⁷⁾.

Nous exposerons brièvement les principaux travaux avant d'aborder nos recherches personnelles, et nous consacrerons un chapitre spécial à l'examen critique des méthodes employées et des résultats obtenus. Nous espérons ainsi apporter dans cette question un peu d'ordre et de clarté.

Historique. — Les premiers auteurs qui soumirent des sérums agglutinants à l'action d'un champ électrique furent :

BILTZ, MUCH et SIEBERT ⁽³⁶⁾ d'abord, qui se servirent du dispositif de HARDY ⁽¹⁾ et obtinrent un déplacement vers l'anode de l'anticorps agglutinant le bacille lactique.

FIELD et TEAGUE ⁽⁹⁾ ensuite, trouvèrent au contraire que l'agglutinine antityphique se déplaçait vers la cathode.

LANDSTEINER et PAULI ⁽¹⁵⁾ réalisèrent enfin des conditions correctes d'électrophorèse, et dès 1907, mirent en évidence le caractère *amphotère* de l'hémoagglutinine naturelle du sérum de poule.

MICHAELIS et DAVIDSOHN ⁽¹⁸⁾ entreprirent de préciser cette notion de corps amphotère. Reprenant avec quelques modifications le dispositif expérimental de Landsteiner et Pauli, ces auteurs recherchèrent dans quelle zone précise de l'échelle des pH l'inversion du signe électrique de l'agglutinine pouvait être obtenue.

Ils utilisèrent, pour leurs recherches, des sérums anti-bactériens (anti-typhiques), dilués dans des solutions tampons de phosphates ou d'acétates destinées à stabiliser les pH , et observèrent ainsi que, dans une zone assez étendue, de pH 5,3 à pH 6, l'agglutination prenait des valeurs sensiblement égales à l'anode et à la cathode. (Voir p. 6 le détail de l'appareil). Cette zone englobant

le point isoélectrique de la sérum globuline que l'on considérerait alors comme le support des propriétés spécifiques des immunsérums, il était naturel que MICHAELIS vit dans ses résultats la confirmation de cette hypothèse. Il plaça donc, au même pH, à pH 5,4, les points isoélectriques de l'agglutinine anti-typhique et de la sérum globuline.

Un examen plus attentif des chiffres qu'il a publiés conduit à penser que ce point est en réalité situé, pour l'agglutinine, dans une région plus alcaline, vers pH 5,7.

SZENT-GYORGYI (³⁷), utilisant le même appareil, et se plaçant dans des conditions identiques, confirma ces conclusions.

V. SCHROEDER (³⁸), par contre, publia des résultats paradoxaux : une iso-hémoagglutinine séparée avec l'eu-globuline posséderait, en présence de phosphates ou d'acétates, un point isoélectrique égal à 4, tandis que dans le liquide de Ringer, à pH 7, elle serait *électropositive*.

OLITZKI (³⁹) donne aussi un pH de 4 comme point isoélectrique de l'agglutinine anti-typhique, cataphorée dans l'immunsérum étendu de solution tampon. Purifiée, elle serait *électronégative*, jusqu'à un pH de 3,6, auquel son activité disparaîtrait.

OTTENBERG et STENBUCH (⁴⁰) enfin, opérant en milieu citraté sur du sérum antityphique ou sur une agglutinine partiellement purifiée trouvent dans les deux cas un pH de 4,4, comme point isoélectrique de l'anticorps.

Recherches personnelles. — Nous avons observé (Tabl. III) que les hémagglutinines des sérums anti-globulaires se déplacent comme les hémolysines. Elles ont la même vitesse et le même point isoélectrique.

Avant d'opposer nos résultats à ceux des auteurs précités, il nous a paru indispensable d'étendre nos investigations aux agglutinines anti-bactériennes, et aux hémagglutinines naturelles.

A) SÉRUMS ANTI-BACTÉRIENS. — Nous nous sommes servi uniquement de sérums de *lapin* (anti-para B, anti-para A, anti-typhique et anti-cholérique), préparés par injections intraveineuses de suspensions microbiennes. (Cultures sur gélose âgées de 24 heures).

Titrages.

1° *Pour l'agglutination*, il n'est pas nécessaire de faire la correction saline avant le titrage ; mais il faut, surtout après cataphorèse en milieu acide, ramener les solutions au voisinage de la neutralité.

2° *Pour la réaction de Bordet-Gengou*, l'antigène (suspension microbienne d'une culture sur gélose) fixe souvent le complément, et d'une manière gênante pour le titrage. En fait, ce ne sont pas les corps microbiens eux-mêmes qui possèdent cette propriété, mais bien les particules de gélose qu'ils entraînent. On évite cet inconvénient en se servant de cultures âgées de 4 à 5 jours, dont la couche superficielle seule est suspendue dans de l'eau physiologique.

L'antigène ainsi préparé ne fixe plus spontanément le complément.

Résultats expérimentaux. — Les tableaux VII et VIII, qui résument les principales expériences faites avec des sérums anti-bactériens, confirment en tout point les résultats que nous ont donnés les sérums hémolytiques :

1° La charge de l'anticorps agglutinant est, en solution de NaCl, *uniquement fonction du pH du milieu.*

Cataphorèse de sérums anti bactériens

TABLEAU VII. — *Sérums anti para-typhique A et B*

Conditions générales : sérum de lapin dilué pour la cataphorèse à 1/30 dans NaCl à 0 gr. 5 %

Exp. n°	pH	Voltage	Durée	Transport de	
				Protéines totales	Anticorps (agglutination)
1 ^o Série : sérum ANTI-PARA B					
1	7,8	25 v. cm.	6 h. 10	80 % vers l'anode	20 à 25 % vers l'anode
2	5,4	24 v. cm.	5 h. 30	50 % vers l'anode	20 % vers la cathode
3	5,9	25 v. cm.	6 h.	55 % vers l'anode	faible vers la cathode
4	6,2	19 v. cm.	6 h.	57 % vers l'anode	pas de transport lisible
2 ^o Série : sérum ANTI-PARA A					
5	7,9	18 v. cm.	5 h. 30	60 % vers l'anode	un peu moins de 20 % vers l'anode
6	5,4	24 v. cm.	6 h. 20	50 % vers l'anode	20 % vers la cathode
7	5,9	24 v. cm.	6 h.	60 % vers l'anode	faible vers la cathode
8	6,2 6,3	20 v. cm.	6 h. 10	60 % vers l'anode	aucun transport lisible

TABLEAU VIII. — *Réactions de Bordet-Gengou et d'agglutination*

Conditions générales : Sérum anti-para B dilué à 1/30 dans NaCl à 0 gr. 5 %. Pour la cataphorèse, de la gélose est interposée à l'anode, entre la gélatine et la solution saline des tubes latéraux. La correction saline est faite avant les titrages.

Exp. n°	pH	Durée	Voltage	Transport des protéines totales	Transport de l'anticorps
1	7,9	6 h.	25 v. cm.	75 % vers l'anode	Les deux réactions donnent un transport de 20 % vers l'anode
2	8,6	6 h.	33 v. cm.	86 % vers l'anode	35 % vers l'anode
3	5,4	6 h.	25 v. cm.	50 % vers l'anode	20 % vers la cathode

2° Nulle pour un pH de 6,2/6,3, (Exp. 4 et 8), elle prend des valeurs opposées et croissantes de chaque côté de ce point. (Exp. 1 à 3 et 5 à 7). Ces valeurs res-

tant toujours très faibles la cataphorèse permet de distinguer l'agglutinine des globulines de l'antisérum même à des pH éloignés de leurs points isoélectriques respectifs.

3° Enfin, ces résultats sont obtenus aussi bien avec la réaction d'agglutination qu'avec la réaction de Bordet-Gengou. (Tableau VIII).

B) HÉMO-AGGLUTININES NATURELLES. — Le sérum de tout animal possède, comme on le sait, le pouvoir d'agglutiner spontanément les hématies d'espèces étrangères ; agglutination masquée, dans les sérums frais, par une hémolyse rapide qui se produit même à la température du laboratoire, mais que deux procédés permettent de mettre en évidence : chauffage à 56° , et vieillissement du sérum, qui font disparaître irréversiblement les hémolysines naturelles seules (*). Ce sont donc des sérums chauffés $30'$ à 56° que nous avons cataphorés.

Électrophorèse des hém-agglutinines naturelles

TABLEAU IX

Conditions générales : Sérums chauffés $30'$ à 56° , cataphorés purs ou dilués aux deux tiers avec de l'eau distillée. L'hémoagglutination ne permettant pas de **titrer quantitativement** des déplacements inférieurs ou égaux à 20 %, les titrages furent uniquement **qualitatifs**. Les sérums de lapin furent éprouvés contre des globules de mouton et d'homme ; les sérums humains, contre des globules de lapin ou de mouton.

Exp. n°	Sérum de	Voltage	Durée	pH	Déplacement de :		Agglutinine
					Protéines totales	Globulines	
1.	Lapin	30 v cm	6 h.	7,8			Net vers +
2	Homme	30 v cm	6 h.	7,4			Net vers +
3	Lapin	30 v cm	7 h.	5,2	20 % vers +	Nul	Net vers —
4	Homme	30 v cm	7 h.	5,3	22 % vers +	Faible vers +	Net vers —
5	Lapin	30 v cm	7 h.	5,4			Net vers —
6	Lapin	28 v cm	5 h. 30	5,6			Net, mais plus faible vers (—)
7	Homme	28 v cm	5 h.	5,7			Faible vers —
8	Homme	28 v cm	6 h.	6			A peine lisible vers (—)
9	Homme	30 v cm	5 h. 30	6,5			Très faible vers +

(*) Le chauffage à 56° détruit à la fois l'alexine et l'hémolysine naturelle. Cette destruction est irréversible.

Par vieillissement, l'hémolysine disparaît beaucoup plus vite que le complément.

Leur pouvoir agglutinant varie évidemment avec la nature du sérum et l'origine des hématies ; nous nous sommes servi de *sérums humains* contre des hématies de mouton ou de lapin, et de *sérums de lapin* contre des globules de mouton ou d'homme. Leur titre étant toujours assez faiblé, la réaction se prête mal à la mesure d'une vitesse de transport ; la recherche du point isoélectrique elle-même a souffert de cette indétermination.

Les expériences réunies dans le tableau IX montrent cependant que les agglutinines naturelles ne semblent pas distinctes des anticorps agglutinants et hémolysants qui apparaissent dans les immunsérums. Elles se transportent dans un champ électrique, et sont ampholytes, comme l'avaient déjà observé LANDSTEINER et PAULI ; en outre, leur vitesse est très faible, et le sens de leur transport s'inverse dans une zone de pH allant de pH 6 à pH 6,5.

Ces observations ont été faites sur des sérums cataphorés purs ou faiblement dilués, et ne dépendent ni de la nature du sérum, ni des hématies qu'ils agglutinent.

C) EXAMEN CRITIQUE DES MÉTHODES ET DES RÉSULTATS. — Les points isoélectriques attribués à l'agglutinine sont donc très divers, et s'échelonnent entre pH 4 et pH 5,7. Nous même le plaçons en un point très différent 6,2/6,3.

Ce sont les causes de ces divergences que nous avons cherché à établir dans ce chapitre ; nous justifierons également notre technique et nos résultats.

Nous ne retiendrons ici ni les travaux de FIELD et TEAGUE ⁽⁹⁾ ni ceux de BILTZ, MUCH et SIEBERT ⁽³⁶⁾, qui utilisèrent des dispositifs que nous avons déjà critiqués.

Mais dans l'appareil de MICHAELIS, qui a servi pour la plupart des autres déterminations, ce ne sont certainement pas des conditions expérimentales défectueuses qui peuvent être rendues responsables de ces écarts. Ni l'osmose électrique, qui est très réduite, ni les modifications de pH , qui se produisent dans les expériences de quelque durée, ni l'imprécision des titrages, ne peuvent expliquer que des chiffres aussi différents que pH 4 et pH 5,7 aient pu être trouvés, avec le même appareil, comme point isoélectrique de l'agglutinine.

OTTENBERG et STENBUCH ⁽⁴⁰⁾ ont suggéré comme cause d'erreur possible la nature de l'antisérum, qui était du sérum de cheval dans leurs expériences, du sérum de lapin dans celles de MICHAELIS. Or tous nos essais ont prouvé que la nature et la concentration de l'antisérum ne modifiaient nullement le comportement des anticorps dans un champ, pas plus, d'ailleurs, que la nature de l'antigène. Leur point isoélectrique et leur densité de charge sont indépendants de tous ces facteurs.

La solution saline employée pour diluer l'antisérum peut, au contraire, jouer un rôle important. Dans nos expériences seules, une solution de NaCl est employée comme solvant ; partout ailleurs, ce sont des mélanges tampons contenant des ions capables de modifier la charge des micelles colloïdiales.

Nous avons signalé l'effet d'anions et de cations polyvalents sur la charge électrique des protéines ; des acétates alcalins, qui pourtant ne contiennent que

des ions monovalents, agissent aussi sur *certaines* albumines. (ABRAMSON, (41)). Comme ces effets ne sont pas seulement fonction de la nature ou de la valence de l'ion actif, mais dépendent aussi des concentrations relatives de ces ions et des micelles qui les adsorbent, des résultats très différents pourront être observés lorsqu'on fera simplement varier la dilution du sérum ou la concentration de la solution saline.

C'est donc là une explication possible de la diversité des points isoélectriques attribués à l'agglutinine, et les expériences dont nous allons exposer le détail sont destinées à montrer l'importance de ces phénomènes d'adsorption.

Nous conservons donc l'appareil qui nous a servi dans nos précédents essais, nous nous plaçons dans les mêmes conditions de durée et de voltage, mais l'anti-sérum est dilué dans des solutions diverses contenant soit des anions, soit des cations polyvalents. Parmi eux, nous avons dû en éliminer un grand nombre qui modifiaient les propriétés de l'anticorps, et rendaient impossibles des titrages précis.

1° Anion polyvalent. Citrate trisodique. (Tableau X). — Nous avons utilisé du citrate trisodique à 2 % ; mais comme ce sel empêche l'hémolyse, même à faible concentration, nous avons cataphoré un sérum agglutinant (anti-para B). L'agglutination microbienne est, elle aussi gênée ; elle est moins nette, moins massive qu'en solution chlorurée pure ; la réaction reste cependant lisible ; elle n'est surtout pas affectée par les différences de concentration saline qui se produisent entre les solutions anodique et cathodique après l'électrophorèse. On peut donc les négliger sans inconvénient, et les titrages se font, comme toujours, par simple dilution dans de l'eau physiologique.

TABLEAU X. — *Electrophorèse en présence d'anion polyvalent.*
Citrate trisodique à 2 %.

Conditions générales : Sérums de lapin anti-para B, Voltage : 30-v cm. Durée : 6 heures.
Dans toutes les expériences faites avec des solutions tampons, les titrages se font après neutralisation.

Exp. n°	Dilution	pH	Protéines totales	Globulines	Agglutinine
1	1/20	5,5 (+ HCl)	40 % vers +	44 % vers +	20 % vers +
2	1/20	4,8 (+ HCl)	33 % vers +	38 % vers +	moins de 10 % vers —
3	1/40	4,1 (+ ac. citrique)	66 % vers +	66 % vers +	15 % vers +

Dans les expériences 1 et 2, le sérum, dilué à 1/20, est amené au pH par HCl N/10 ; dans l'expérience 3, la dilution est portée à 1/40, et les pH atteints par adjonction d'acide citrique.

2° Cathion polyvalent. Chlorure de calcium. (Tableau XI). — Nous n'avons pas trouvé de cathion trivalent qui soit sans action sur les propriétés des immun-sérums. Le lanthane, même à faible dose, agglutine spontanément les microbes, et empêche l'hémolyse. Nous avons donc choisi un cathion divalent, le Ca^{++} , employé sous forme de chlorure. (Solution à 0 gr. 55 %). Les pH étaient obtenus par adjonction de HCl ou de NaOH. Le calcium étant sans action sur l'hémolyse aux doses utilisées, nous nous sommes servi de sérum anti-mouton pour ces expériences.

TABLEAU XI. — *Electrophorèse en présence de cathion polyvalent*
Chlorure de Calcium à 0 gr. 55 %

Conditions générales : Sérum de cheval anti-mouton. Champs 30 v cm. Les titrages sont faits au moyen des réactions d'agglutination (AG) ou d'hémolyse (H).

Exp. n°	Dilution	Durée	pH	Protéines totales	Globulines	Anticorps
1	1/20	6 h.	6,3	35 % vers +	22 % vers +	AG net vers —
2	»	»	6,5	35 % vers +	25 % vers +	AG net vers —
3	1/20	6 h.	6,2 6,3	30 % vers +	20 % vers +	AG net vers — H 30 % vers —
4	1/40	5 h.	6,4	30 % vers +	20 % vers +	AG net vers — H 25 % vers —
5	1/40	6 h.	6,6			H 20 % vers —
6	1/40	6 h.	6,8 à 7			H 10 à 15 % vers —
7	1/40	5 h. 30	7	28 % vers +	35 % vers +	AG faible vers — H 10 % vers —
8	1/40	5 h.	7,1 à 7,3	25 % vers +	33 % vers +	H 5 % vers —
9	1/40	5 h.	7,5	30 % vers +	35 % vers +	AG pas de transport H » » »

Elles sont assez difficiles à réaliser correctement : l'osmose électrique, qui existe toujours à travers un gel de gélose, (interposé à l'anode entre la gélatine et la solution saline dans la cataphorèse des sérums hémolytiques) est beaucoup plus considérable en présence d'ions Ca^{++} , qu'en présence d'ions Na^+ . Le gel se déshydrate très fortement pendant le passage du courant, et n'arrête plus qu'imparfaitement les cathions provenant de la gélatine qui accélèrent l'hémolyse. La concentration du gel doit être augmentée jusqu'à 6 % au moins, ce qui rend la lecture des pH délicate et entraîne des modifications parfois importantes dans la réaction des sérums cataphorés.

3° Sels mono-monovalents. Acétate de soude/acide acétique, et chlorure d'ammonium/ammoniaque. (Tableau XII).

Nous avons également recherché l'action de deux sels fréquemment utilisés comme tampons, et constitués par un acide faible/base forte, ou par un acide fort/base faible.

TABLEAU XII. — *Electrophorèse en présence de sels mono-valents*A) *Acétate de soude à 0 gr. 7 %/acide acétique.*

Conditions générales : Sérum de cheval anti-mouton dilué à 1/40. Champs 30 v. cm. Durée : 6 heures. L'expérience 6 est faite, à titre de contrôle, avec du sérum anti-para B.

Exp. n°	pH	Protéines totales	Globulines	Anticorps
1	6	66 % vers +	80 % vers +	30 % vers +
2	5,5	40 % vers +	60 % vers +	10 à 15 % vers +
3	5,2	35 % vers +	40 % vers +	Dans ces deux expériences, l'hémolyse ne se produit plus dans le liquide, qui C est précipité; T et A ont des activités voisines.
4	5,2	38 % vers +	45 % vers +	
5	4,8	Nul	5 % vers +	La cathode seule hémolyse, le témoin et l'anode sont inactifs.
6 (anti para B)	5,1	30 % vers +	35 % vers +	Le témoin agglutine, mais l'anode et la cathode sont inactives.

B) *Chlorure d'ammonium à 0 gr. 25/NH⁴OH.*

Conditions générales : Sérum anti-mouton. (Exp. 1 à 8) et anti-cholérique. (Exp. 9 à 11) dilués à 1/40. Voltage 30 v cm : Durée 5 à 6 heures.

Exp. n°	pH	Protéines totales	Globulines	Anticorps
1	5,4	38 % vers +	15 % vers +	20 à 25 % vers —
2	6,4	40 % vers +	33 % vers +	Nul ou très faible vers —
3	6,6	40 % vers +	35 % vers +	Nul
4	6,8	45 % vers +	40 % vers +	Nul
5	6,9	45 % vers +	40 % vers +	Nul
6	7,1	55 % vers +	50 % vers +	Nul ou très faible vers +
7	7,6	50 % vers +	45 % vers +	5 % vers +
8	8,4	55 % vers +	50 % vers +	15/20 % vers +
9	6,3	35 % vers +	30 % vers +	Nul
10	6,9	40 % vers +	35 % vers +	Nul
11	7,1	40 % vers +	35 % vers +	Nul

Ces sels furent utilisés en solution à 0 gr. 7 % (acétate de soude) et 0 gr. 25 % (chlorure d'ammonium) ; les pH obtenus par adjonction de CH³COOH ou de NH⁴OH.

L'électrophorèse fut faite avec du sérum anti-mouton dilué à 1/40, et avec des sérums agglutinants (anti-para B et anti-cholérique).

Résultats expérimentaux. — Ces expériences confirment l'hypothèse qui nous les a suggérées : l'anticorps adsorbe très fortement les ions polyvalents qui se trouvent en sa présence, et nous avons constaté que le sens de son transport peut aussi bien s'inverser à pH 7,5, en présence de Ca⁺⁺, qu'à un pH inférieur à 4, en présence de citrate (Exp. 3, tableau X et exp. 9, tableau XI).

Cette déviation se fait dans le sens prévu : vers les pH acides en présence

d'anions actifs, vers les pH alcalins, en présence de cations. Elle est importante à la fois pour les protéines et pour l'anticorps : en milieu citraté, par exemple, les globulines acquièrent une vitesse supérieure à celle des albumines, et l'anticorps conserve une charge négative à pH 5,5. Cette charge s'inverse vers pH 5, alors que les protéines continuent à se déplacer vers l'anode.

On obtient une déviation plus considérable en employant le sérum à une plus forte dilution, et en remplaçant l'acide chlorhydrique par de l'acide citrique, pour l'amener au pH convenable. (Tableau X, exp. 3).

En présence des ions NH_4^+ , la charge électrique des protéines n'est pas modifiée. (Tableau XII B, exp. 1) Pour l'anticorps, au contraire, on observe une large zone isoélectrique s'étendant de pH 6,4 à pH 7. (Exp. 2 à 6).

Les ions CH_3COO^- sont également sans action sur les albumines ; (Tableau XII A, exp. 5) mais le point isoélectrique des globulines et surtout celui de

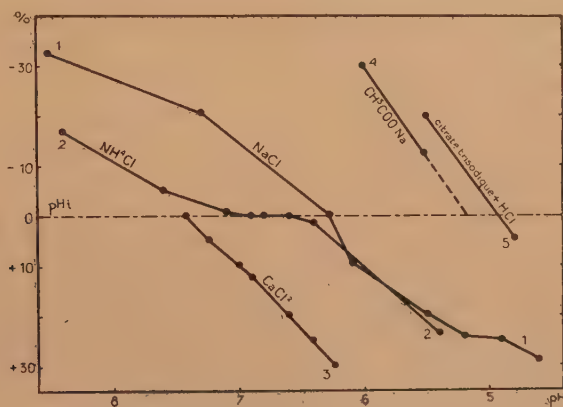


Fig. 9. — Déplacement de l'anticorps, cataphoré dans des solutions salines diverses. Champs voisins de 30 v.cm.

l'anticorps sont fortement déviés vers les pH acides (de 0,5 et 1 unité dans les conditions que nous avons choisies). *Le point isoélectrique de l'anticorps vient donc se confondre avec celui que possède la sérum globuline en milieu de NaCl (pH 5,2).*

Ainsi donc, dans les conditions réalisées jusqu'ici pour cataphorer des sérums agglutinants, toutes sortes de valeurs pouvaient être trouvées, dans la zone acide comme dans la zone alcaline, comme point isoélectrique apparent de l'anticorps ; il suffisait de faire varier la nature de l'ion actif, sa concentration, et la dilution du sérum (fig. 9).

Il n'est pas un seul des résultats que nous avons énumérés (p. 27 et 28), que ce mécanisme ne suffise à expliquer : c'est en milieu citraté qu'ont opéré OTTENBERG et STENBUCH ; c'est eux aussi qui placent vers les pH les plus acides, à pH 4,4, le point isoélectrique de l'agglutinine. En utilisant le mélange acide acétique/acétate de soude à faible concentration et un sérum dilué à 1/10 seulement, MICHAELIS trouve une déviation beaucoup plus faible : 0,5 unité pH.

Si OLITSKI enfin, ne peut obtenir le renversement du signe électrique de

l'agglutinine purifiée, ce n'est pas qu'il ait modifié l'anticorps au cours de la purification ; il a simplement, en éliminant les protéines de l'antisérum, qui adsorbent les phosphates disodiques utilisés comme tampons, augmenté la concentration des ions actifs par rapport aux molécules d'agglutinine.

Dans nos expériences, nous avons dilué l'antisérum dans des solutions de NaCl. Or la vitesse des micelles colloïdales est seule affectée par des variations de concentration de ce sel : elle décroît pour des concentrations croissantes, mais les vitesses relatives des diverses particules, ou leur point isoélectrique ne subissent aucune modification. (ABRAMSON ⁽⁴⁴⁾ SANDOR ⁽⁵¹⁾).

C'est en effet ce que nous avons constaté dans les expériences suivantes : (Tableau XIII).

Électrophorèse de sérums hémolytiques

TABLEAU XIII. — Influence de la concentration de NaCl sur la vitesse de déplacement et le point isoélectrique de l'anticorps

Exp. n°	pH	Durée	Voltage	NaCl ‰	Protéines totales	Globulines	Anticorps
1	8,4	6 h. 30	20 v cm	0 gr. 15	50 % vers +	40 % vers +	20 % vers +
2		6 h.	»	0 gr. 5	68 % vers +	25 30 % vers +	25 30 % vers +
3		6 h. 30	30 v cm	0 gr. 4	95 % vers +	85 % vers +	40 % vers +
4		6 h. 30	»	0 gr. 4	90 % vers +	85 % vers +	40 % vers +
5		6 h.	»	0 gr. 5	85 % vers +	80 % vers +	35 % vers +
6		6 h.	»	0 gr. 6	75 % vers +	66 % vers +	un peu inf. à 30 %
7	5,4	6 h.	30 v cm	0 gr. 15	50 % vers +		20 % vers —
8		6 h.	»	0 gr. 5	47 % vers +	15 % vers +	20 % vers —
9		4 h. 45	25 v cm	0 gr. 5	30 % vers +	10 % vers +	un peu moins de 20 % vers —
10		4 h. 45	»	0 gr. 6	30 % vers +		15/20 % vers —
11	5,5	2 h.	65 v cm	0 gr. 008	50 % vers +	25 % vers +	20 % vers —
12		3 h. 30	30 »	0 gr. 008	50 % vers +	20 % vers +	20 % vers —
13		6 h.	30 »	0 gr. 5	40 % vers +	12 % vers +	un peu moins de 20 % vers —
14	5,6	3 h. 30	35 v cm	0 gr. 008	50 % vers +	30 % vers +	un peu moins de 20 % vers —
15		6 h.	30 v cm	0 gr. 5	57 % vers +	40 % vers +	un peu plus de 20 % vers —
16	6,1	5 h. 30	30 v cm	0 gr. 4	60 % vers +	45 % vers +	10 % vers —
17		»	»	0 gr. 5	58 % vers +	43 % vers +	10 % vers —
18	6,2	2 h.	65 v cm	0 gr. 008	80 % vers +		Faible vers —
19		6 h.	30 v cm	0 gr. 5	66 % vers +		Faible vers —
20	6,3	2 h.	65 v cm	0 gr. 008	80 % vers +	50 % vers +	
21		4 h. 30	30 v cm	0 gr. 008	80 % vers +	50 % vers +	
22		6 h.	»	0 gr. 2	80 % vers +		Faible vers +
23		»	»	0 gr. 3	80 % vers +	50 % vers +	
24		»	»	0 gr. 5	70 % vers +		

Du sérum anti-mouton, débarrassé des eu-globulines par dilution avec de l'eau distillée et acidification, est mis à dialyser à la glacière (10 et 15 jours).

On cataphore, après adjonction de quantités variables de NaCl, ou sans adjonction de sel. Dans ce cas, la concentration saline est très faible, de l'ordre de 0 gr. 008 %.

1° Le point isoélectrique des protéines et de l'anticorps est indépendant de la concentration de NaCl. (Exp. 16 à 24).

2° Les vitesses décroissent pour des concentrations croissantes de sel. (Exp. 3 à 6, 12 et 13). Les exceptions apparentes (exp. 1 et 2) sont dues à des variations dans l'intensité du courant, qui n'ont pas permis de conserver des champs de valeurs comparables.

3° Le rapport de ces vitesses est le même dans la solution dialysée et en présence de concentrations salines diverses (0 gr. 15 à 0 gr. 6). (Fig. 10 et 11).

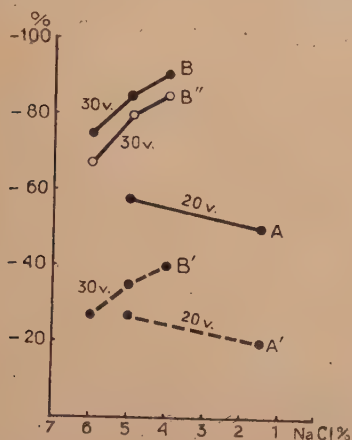


Fig. 10.

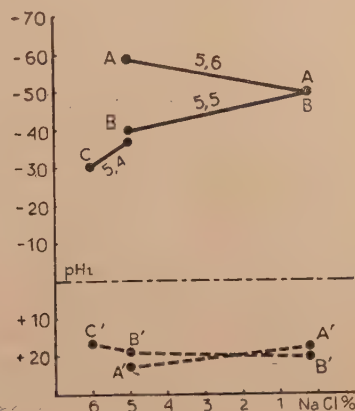


Fig. 11.

Fig. 10. — Déplacement des protéines totales (A et B), des globulines (B'') et de l'anticorps (A' et B') en présence de solutions de NaCl de concentrations diverses.

Fig. 11. — Déplacement des protéines totales (A, B, C) et de l'anticorps (A', B', C'), en présence de solutions de NaCl de concentrations diverses.

A. et A' : pH 5.6.
B. et B' : pH 5.5.
C. et C' : pH 5.4.

Conclusion. — Le point isoélectrique que nous avons déterminé doit donc correspondre, aux erreurs expérimentales près, au point isoélectrique vrai de la molécule d'anticorps (point iso-ionique) que seules permettraient d'atteindre des courbes de titrage.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux que donne l'électrophorèse des antigènes sensibilités, hématies, bactéries, visibles au microscope, et dont on peut mesurer la vitesse absolue.

Normalement, globules et bactéries ont une charge négative, qui s'annule seulement dans des milieux très acides, correspondant à une altération irréversible (ABRAMSON (44)). Cataphorés dans du sérum normal, ils se transportent comme dans une solution de NaCl ; dans leur immunsérum spécifique, leur vitesse change, et leur signe électrique s'inverse à des pH beaucoup plus alcalins.

La sensibilisation fait donc perdre à ces antigènes leurs caractères électriques, et leur confère, vraisemblablement, ceux de l'anticorps. On devrait donc

retrouver le point isoélectrique voisin de 6,2, et la faible densité de charge qui caractérisent agglutinines et hémolysines.

La diminution de vitesse a, en effet, toujours été constatée ; (COULTER ⁽⁴²⁾ SCHIBBLEY ⁽⁴¹⁾ ABRAMSON ⁽⁴³⁾) mais le point isoélectrique a été fixé à 5,3 par COULTER pour des hématies, à 4,7 par NORTHROP et de KRUIF ⁽⁴⁵⁾ pour le bacille typhique, à 5,4 par COULTER ⁽⁴²⁾ pour le colibacille. Tous ces auteurs croient ainsi pouvoir assimiler les anticorps aux globulines.

Cependant, Mac CUTCHEON, MUDD, STRUMIA et LUCKE ⁽⁴⁶⁾ reprenant ces expériences, ont montré que le point isoélectrique du *Mycobacterium avium*

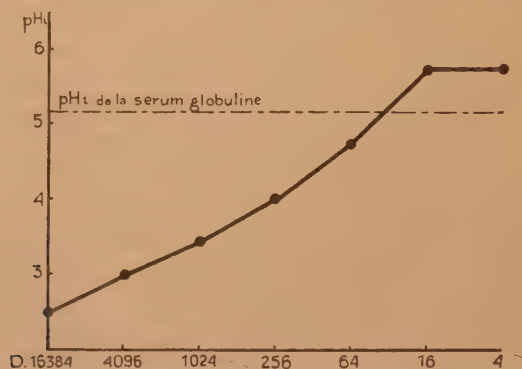


Fig. 12. — Point isoélectrique du *Mycobacterium avium* en fonction de la dilution de l'antisérum.

est fonction de la *concentration de l'anti-sérum* qui a servi à le sensibiliser. (Fig. 12). Situé à pH 2,5, pour une dilution de 1/16.000, il passe par pH 5,2, pour une dilution de 1/64, et atteint la valeur maxima de 5,8 pour des dilutions allant de 1/16 à 1/4.

De même, des particules de collodion recouvertes de protéines, possédant par conséquent, le point isoélectrique et la densité de charge de ces protéines dissoutes, perdent ces caractères après contact avec un sérum anti-protéine ; leur point isoélectrique maximum devient égal à celui des *bactéries sensibilisées*, 5,8. Or, d'après ces auteurs, la charge des globulines de l'antisérum s'inverse à pH 5,2 ; *ce ne sont donc certainement pas elles qui recouvrent la surface de l'antigène.*

Mac CUTCHEON hésite cependant à leur refuser un rôle dans la sensibilisation, et il suppose que ce pH 5,8, n'est peut-être pas le point isoélectrique de la substance sensibilisante elle-même, mais celui qu'elle acquiert après contact avec l'antigène. Nos expériences ne permettent pas de retenir une telle interprétation : c'est bien dans l'antisérum, sans traitement préalable ni contact avec l'antigène que l'anticorps se distingue des globulines qui l'accompagnent.

Les antigènes sensibilisés doivent avoir en réalité un point isoélectrique supérieur à 5,8, car Mac CUTCHEON les a cataphorés dans une solution d'acétate de soude/acide acétique. (Cf. MICHAEELIS).

La présence des ions CH_3COO^- explique en partie l'action de la dilution du sérum sur la déviation de ce point. Pour de fortes dilutions de l'antisérum, une autre raison doit intervenir : l'anticorps n'est sans doute pas en quantité suffisante pour recouvrir entièrement la surface de l'antigène, dont la charge propre intervient aussi.

Il y aurait évidemment intérêt à reprendre ces expériences, en tenant compte de ces données.

Avec une méthode très différente, FELTON ⁽⁴⁷⁾ et EAGLE ⁽²⁷⁾ aboutissent à une semblable conclusion. Le minimum de solubilité d'une solution d'agglutinine purifiée n'est pas celui d'une solution de globulines ; il est situé à des pH plus alcalins, 6,6 d'après FELTON, 6,2 à 6,4 d'après EAGLE.

III

SÉRUMS PRÉCIPITANTS

Le titrage des sérums précipitants se présente sous un aspect un peu particulier, car il est impossible de comparer des systèmes à une seule variable, de faire, par conséquent, des mesures quantitatives. Les résultats que nous avons obtenus dans la cataphorèse de ces sérums n'auront pas la rigueur de ceux que nous venons d'exposer : il n'était même pas évident qu'une interprétation des expériences fût possible ; elle n'avait jusqu'ici jamais été tentée.

Titrages. — Deux méthodes peuvent être utilisées :

1° La première, que l'on trouve décrite dans tous les traités classiques, consiste à mettre l'immunsérum pur en présence de l'antigène porté à des dilutions diverses. Un anneau blanc, opaque, apparaît à la surface de séparation des deux liquides ; il est constitué, en majeure partie, par les globulines de l'antisérum.

Le titre est ainsi défini par la plus haute dilution à laquelle l'antigène donne encore une réaction positive.

2° Dans la deuxième méthode, la dilution de l'antigène reste constante ; celle de l'antisérum, que l'on fait varier, définit le titre de l'anticorps. La dilution peut se faire avec de l'eau physiologique, ou avec du sérum d'un animal de même espèce. Les deux procédés nous ont donné des résultats comparables.

Un trouble uniforme apparaît dans l'immunsérum ; la réaction est moins nette que la précédente, mais elle semble correspondre d'une manière plus rationnelle au titre de l'anticorps.

Nous avons utilisé l'un et l'autre procédé de titrage.

Mais une difficulté demeure : l'antigène intervient dans la réaction par sa seule présence, et l'antisérum contient à la fois les éléments de la précipitation et l'anticorps qui la produit. Les liquides prélevés à l'anode et la cathode, contenant des quantités de protéines différentes, ne peuvent être titrés dans des conditions identiques, et le déplacement des précipitines ne peut se prêter à aucune mesure précise. Il n'était même pas certain qu'il pût être mis en évidence, la valeur de la précipitation pouvant aussi bien dépendre de la concentration des protéines précipitables, que de celle de l'anticorps.

Nous pensions donc pouvoir simplement recueillir des indications qui nous

autoriseraient à assimiler les précipitines aux agglutinines et aux hémolysines, ou au contraire, à leur reconnaître une nature différente.

Cataphorer en milieu alcalin présentait peu d'intérêt ; en milieu acide, par contre, les essais pouvaient être concluants, les globulines se déplaçant faiblement à ce pH . (Ce sont surtout les globulines de l'antisérum que l'on retrouve dans le précipité).

Ces expériences ont été beaucoup plus nettes que nous ne pouvions l'espérer.

Processus expérimental. — Le sérum précipitant est du sérum de lapin *anti-sérum* humain.

Il a été préparé par trois injections intraveineuses de 1 cc. de sérum humain pur, chauffé 30' à 56°. Les injections ont été faites à deux jours d'intervalle, et le sang prélevé 15 jours après la dernière injection.

Le titre de ces sérums est assez variable ; il est indispensable, pour faire de bonnes observations, d'utiliser des sérums très actifs.

La cataphorèse se fait avec du sérum pur ou dilué aux 2/3 avec de l'eau distillée ; pour le titrage, il n'est pas indispensable de faire la correction saline ou de ramener à la neutralité, la précipitation spécifique n'étant pas affectée par le début de floculation qui se produit en milieu légèrement hypotonique et de faible acidité (pH 5 à 6).

L'antigène est du sérum humain dilué dans de l'eau physiologique ; les dilutions ont varié de 1/10 à 1/5.000, pour la première méthode de titrage.

Pour la deuxième méthode, l'antigène est utilisé pur, et l'antisérum dilué à 1/5, 1/10, 1/20 et 1/30.

Résultats. — 1° En milieu alcalin, à pH 7,8, la réaction est plus intense à l'anode qu'à la cathode, effet qui peut aussi bien être dû au transport des protéines qu'à celui de l'anticorps. (Exp. 1 et 2).

2° En milieu acide, à pH 5,2, 5,4, (Exp. 3 et 4) les globulines sont immobiles dans le champ, ou se transportent encore faiblement vers l'anode. La précipitation est cependant beaucoup plus forte dans le liquide *cathodique* que dans le témoin ; elle est, au contraire, affaiblie dans le liquide anodique.

Lorsque, partant de pH 5,2, on se rapproche de la neutralité, la réaction va s'affaiblissant progressivement au pôle négatif, pour s'intensifier au pôle positif. Malgré un transport important des globulines à l'anode (38 % dans l'expérience 11), elle finit par prendre une valeur identique aux deux pôles à un pH de 6,2/6,3, que nous savons précisément être le point isoélectrique de l'agglutinine et de l'hémolysine. (Exp. 5 à 9). Vers pH 6,4, enfin, on observe de nouveau un transport net vers l'anode. (Exp. 10).

Conclusion. — La précipitation spécifique diffère donc moins des autres réactions d'immunité qu'on ne pourrait le supposer à première vue. Rien ne permet de distinguer l'anticorps qui la produit des agglutinines et des hémoly-

Électrophorèse des sérums précipitants

TABLEAU XIV

Conditions générales : Sérums de lapin anti-sérum humain, cataphorés purs ou dilués aux 2/3 avec de l'eau distillée.

Exp. n°	pH	Volt.	Durée	Protéines totales	Globulines	Anticorps
1	7,8	25 v cm	5 h.	64 % vers +	50 % vers +	Important vers +
2	7,8	25 v cm	5 h.	65 % vers +	50 % vers +	Important vers +
3	5,2	25 v cm	7 h.			Important vers —
4	5,2	25 v cm	5 h. 30	42 % vers +	Nul	Important vers —
5	5,8	25 v cm	5 h. 30	20 % vers +	5 % vers +	Net vers —
6	5,9	25 v cm	6 h.	19 % vers +	5 % vers +	Net vers —
7	5,9 à 6	25 v cm	6 h.	25 % vers +	7 % vers +	Faible vers —
8	6 à 6,2	30 v cm	5 h. 30	33 % vers +	20 % vers +	Très faible vers —
9	6,1	28 v cm	7 h.	50 % vers +	33 % vers +	Très faible vers —
10	6,4	28 v cm	7 h.	55 % vers +	40 % vers +	Très faible vers +
11	6,2	28 v cm	7 h.	50 % vers +	38 % vers +	Pas de transport lisible

sines : son point isoélectrique, et semble-t-il, sa vitesse dans le champ sont les mêmes.

Son indépendance vis-à-vis des globulines auxquelles il semblait plus particulièrement lié n'est pas moins nette. Indépendance qui se traduit par des caractères électriques différents, et par le rôle que chacun deux joue dans la précipitation.

Dans les conditions normales, cette dissociation ne peut être faite ; mais dans les expériences que nous avons exposées, il devient évident que la valeur de la réaction ne dépend aucunement de la quantité de globulines précipitables, mais du rapport antigène-anticorps qui se trouvent en présence. En cela, la précipitation spécifique est une véritable réaction d'immunité, la floculation des globulines étant un simple indicateur d'un phénomène qui se passe en dehors d'elle : réaction de l'antigène et de son anticorps spécifique.

Note : Rappelons que c'est précisément la précipitation spécifique qui a conduit un grand nombre d'auteurs à identifier globulines et anticorps. Cette opinion est actuellement très fortement répandue. (SCHIBBLEY ⁽⁴³⁾, HEILDERBERGER ⁽⁴⁸⁾ JOFFE ⁽⁴⁹⁾, etc.)

IV

SÉRUMS SYPHILITIQUES

Nous avons vu que la réaction de fixation du complément, (BORDET-GENGOU), aussi bien que l'agglutination, la précipitation ou l'hémolyse, met en évidence le déplacement de l'anticorps dans un champ électrique. On pouvait se demander si les réactions spécifiques des sérums syphilitiques, bien qu'elles ne soient pas provoquées par un anticorps vrai, subiraient, après cataphorèse, des modifications du même ordre.

En effet si l'on eut à l'origine pouvoir assimiler la réaction de Bordet-Wassermann à une réaction de fixation du complément classique, on dut très vite lui reconnaître des caractères tout à fait différents. On voulut, alors, la rattacher aux réactions de floculation qui caractérisent, au même titre, les sérums syphilitiques : toutes ces réactions mettraient seulement en évidence l'*instabilité* particulière de ces sérums, leur aptitude à floculer à présence d'« antigène ». Dans cette conception, la fixation du complément devient un phénomène accessoire, d'ordre purement physique, comme l'est, par exemple, son adsorption par divers corps pulvérulents.

Cette assimilation, basée sur la nature et l'origine communes de la suspension colloïdale qui sert d'antigène, (suspension dans l'eau physiologique de lipoides organiques) n'est cependant pas admise par un groupe important de sérologistes, en particulier par SACHS et ses collaborateurs.

Les expériences que nous allons exposer ont eu pour but de rechercher si la cataphorèse permettrait d'attribuer des caractères distincts à ces différentes réactions : réactions de floculation, de Bordet-Gengou, et de Bordet-Wassermann.

Conditions d'expérience. — Nous avons cataphoré des sérums fortement positifs (positifs au Bordet-Wassermann et au Kahn après dilution à 1/10 au moins), dépourvus de pouvoir anti-complémentaire, inactivés par chauffage à 56°, et utilisés purs ou dilués à 1/5 généralement, dans des solutions de NaCl de titre variable : à 0 gr. 9 % dans les premiers essais, pour éviter les perturbations que pourrait entraîner un état de dispersion anormal des globulines, à 0 gr. 5 % ensuite.

1° *Réaction de Bordet-Wassermann.* — Les gels choisis pour la cataphorèse furent — comme pour les sérums hémolytiques — de la gélose et de la gélatine à l'anode, de la gélatine seule à la cathode.

Pour la réaction de Bordet-Wassermann, nous avons utilisé :

L'antigène et le complément à doses constantes, fixées par un titrage préalable.

Les solutions témoins, anodiques et cathodiques, ramenées à 0 gr. 9 % de NaCl, à doses croissantes, de 0 cc. 1 à 0 cc. 5, et à la dilution limite qui donne une réaction positive. (Cf. titrage des anticorps). Pour chaque dose, nous faisons naturellement un tube contenant l'antigène, et un tube témoin sans antigène.

Résultats. — Après avoir soumis des sérums syphilitiques à des champs de 25 à 30 volts cm., pendant 6 à 7 heures, nous avons fait les observations suivantes :

a) Les solutions anodiques et cathodiques possèdent une action propre sur le système hémolytique utilisé ; en leur présence, l'hémolyse est généralement plus rapide qu'avec le sérum témoin. Cette activation n'a rien de spécifique, puisqu'on l'observe aussi après cataphorèse de sérums humains normaux. (Tableaux XV et XVI). Elle se produit, avec une moindre intensité, dans les sérums dialysés contre une solution de NaCl. (Exp. 4, tableau XV^{bis}).

Électrophorèse des sérums syphilitiques

TABLEAU XV. — Réaction de Bordet-Wassermann.

Conditions générales : Sérums syphilitiques dilués par la cataphorèse à 1/25 dans une solution de NaCl à 0 gr. 6 %.

Champ de 20 volts par cm. Durée : 7 heures.

La réaction de B. W. est faite avec les solutions anodique, cathodique et témoin, ramenées à 0 gr. 9 % de NaCl et diluées à 1/50 ; les doses employées sont de 0 cc. 1 à 0 cc. 5. Pour chaque dose, il y a un tube sans antigène (témoin sérum) et un tube contenant l'antigène. La lecture se fait au bout de 30' pour la réaction de B. W., au bout de 10' pour les témoins sérums.

Exp. n°	pH	Déplacement des protéines totales	Témoins sérums	Réaction de B. W.
1	8,4	72 % vers l'anode	T H4.H4.H4.H4.H4. A H5.H6.H6.H6.H6. C H6.H6.H7.H8.H8.	H8.H3.H0.H0.H0. H8.H7.H5.H3.H1. H8.H8.H8.H7.H7.
2	5,8	56 % vers l'anode	T H4.H4.H4.H4.H4. A H8.H6.H5.H4.H3. C H8.H6.H5.H4.H3.	H8.H8.H0.H0.H0. H8.H8.H7.H2.H0. H8.H8.H6.H2.H0.
3	8,4	75 % vers l'anode	T H6.H6.H6.H8.H6. A H7.H6.H6.H6.H6. C H8.H8.H8.H6.H8.	H8.H8.H5.H0.H0 H8.H8.H5.H0.H0. H8.H8.H5.H6.H5.

TABLEAU XV bis. — Electrophorèse de sérums syphilitiques dialysés pendant 6 jours contre une solution de NaCl à 0 gr. 9 %, et dilués pour l'expérience à 1/7.

Les conditions sont celles du tableau 15

pH	Protéines	Globulines	Témoins sérums	Réaction de B. W.
5,2	23 % vers +	Pas de transport	T H6.H5.H5.H5. A H6.H5.H5.H5. C H7.H6.H6.H6.	H3.H2.H1.H0. H3.H2.H1.H0. H6.H3.H2.H1.
6,6	66 % vers +	60 % vers +	T H5.H5.H5.H5. A H6.H6.H5.H5. C H7.H6.H6.H6.	H4.H2.H1.H0. H4.H2.H1.H0. H5.H4.H2.H1.

TABLEAU XVI. — *Electrophorèse de sérums normaux-humains.*

Conditions générales : Ce sont celles des expériences précédentes. L'hémolyse est faite en présence de doses croissantes de sérum (cataphoré ou non), comme dans les témoins sérums des expériences précédentes.

	pH	Protéines	Témoins sérums
	7,8	66 % vers l'anode	T H5.H5.H5.H5.H5. A H6.H7.H8.H8.H8. C H8.H8.H8.H7.H8.

Elle est toujours peu marquée, mais souvent plus à l'un ou l'autre pôle, sans que le sens ou la valeur de cet accroissement soit en rapport avec la durée des expériences, la valeur du champ utilisé, ou le pH auquel la cataphorèse a été effectuée. (Exp. 1 et 2, tableau XV).

b) En présence d'antigène, cette activation persiste, et c'est à elle qu'est dû l'affaiblissement subi par le Wassermann dans ces mêmes solutions. Dans les expériences où nous ne l'avons pas observée, la réaction conserve, en effet, dans les liquides cataphorés, la valeur qu'elle avait initialement dans le sérum. (Exp. 3, anode).

Conclusion. — Le pouvoir de fixer le complément qui caractérise les sérums syphilitiques mis en présence de solutions colloïdales de lipoides organiques ne paraît donc pas lié à des particules mobiles dans un champ. En effet, l'activation que nous avons constatée n'est jamais suffisante pour masquer le sens d'un transport, fût-il aussi faible que celui des anticorps.

2° REACTIONS DE FLOCCULATION. — Nous avons choisi la réaction de Kahn, parce qu'elle exige peu de sérum, et reste positive malgré la dilution. Elle se prête donc à une mesure-grossière-d'activité.

La réaction se fait selon la technique fixée par son auteur ; les doses de sérum restant constantes, ce sont les dilutions que nous avons fait varier, régulièrement, de 1/10, autour de la dilution limite qui donne une réaction positive.

Il n'est pas nécessaire de faire la correction saline, mais indispensable de ramener les solutions à un pH voisin de la neutralité : en milieu de faible alcalinité — pH 7,8 —, la réaction ne se produit pas, et à des pH acides (jusqu'à pH 6), la flocculation peut se produire même en l'absence de sérums pathologiques.

Résultats. — L'électrophorèse des sérums syphilitiques montre :

1° Que dans les expériences faites en milieu alcalin, à pH 7,8, la réaction de Kahn est, après neutralisation, plus positive dans la solution anodique que dans le sérum témoin, affaiblie, au contraire, à la cathode. Cet effet persiste à des pH beaucoup plus acides, (exp. 3 à 7, tableau XVII), mais il va s'affaiblissant à mesure qu'on s'éloigne de la neutralité. A pH 5,4 (exp. 8), il est à peine marqué ;

Électrophorèse des sérums syphilitiques

TABLEAU XVII. — Réaction de Kahn.

Conditions générales : Les sérums sont cataphorés purs ou dilués (1/2 à 1/10) dans une solution de NaCl à 0 gr. 6 %. Voltage : 20 à 30 volts cm. Titration : réaction de Kahn. Les dilutions du sérum varient de 5 à 10/10.

Exp. n°	Durée	pH	Déplacement des protéines totales	Déplacement des globulines	Réaction de Kahn
1	7 h.	8,4	75 % vers +		Transport très fort vers + (après neutralisation)
2	6 h.	9	80 % vers +		T (±) (faiblement positif) A ++ (fortement positif) C — (négatif)
3	6 h.	7	40 % vers +	18 % vers +	Dilution 10/10 9/10 8/10 7/10 6/10 T ++++ ++++ ++++ ++++ + A +++++ +++++ +++++ +++++ +- C ++++ ++++ ++++ ++++ (±)
4	6 h.	6,6			10/10 9/10 8/10 T ++ + + A ++++ ++ + C + (±) —
5	7 h.	6,5	50 % vers +	30 % vers +	T ++++ ++++ ++++ ++++ ++++ A +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ C ++++ ++++ ++++ ++++ —
6	7 h.	5,8	30 % vers +	15 % vers +	T ++++ ++++ + + — A +++++ +++++ ++++ ++ — C ++++ ++++ ++ — —
7	6 h.	5,8	50 % vers +	25 % vers +	T — (positif à une dilution moindre que celle A +— qui a été utilisée pour la cataphorèse). C —
8	6 h.	5,4	50 % vers +	très faible vers +	très faible vers +
9	6 h.	5,1	15 % vers +	faible vers —	faible vers —
10	6 h.	5	10 % vers +	10 % vers —	D : 10/10 9/10 8/10 7/10 T ++ + + — A + + — — C ++++ ++++ + ±
11	6 h.	4,9	nul	15 % vers —	T ++++ ++++ + + A ++++ ++++ — — C ++++ ++++ ++++ ++++
12	6 h.	4,5	20 % vers —	20 % vers —	T +++++ ++++ + + — A + + — — — C +++++ +++++ +++++ +++++ +

++++ signifie floculation à gros grains.
+ » floculation fine mais nette.
+— » » à peine visible.
— » pas de floculation.

un peu plus bas, il s'inverse, et à pH 5,1, (exp. 9) c'est au contraire la solution cathodique qui floccule mieux que le témoin, et surtout que la solution anodique.

Discussion. — Dans toutes nos expériences, affaiblissements et accroissements semblent se compenser ; et comme ils sont nuls à un pH de 5,2 environ, pour s'inverser de part et d'autre de ce point, ils sont bien dus à un transport de la substance qui floccule en présence d' » antigène ».

Cette substance est amphotère ; son point isoélectrique et sa densité de charge la rapprochent des protéines, des globulines surtout, auxquelles il semble qu'on puisse l'assimiler.

Conclusion. — L'électrophorèse met donc en évidence une différence essentielle entre les réactions de Bordet-Gengou, de Bordet-Wassermann, et de flocculation. (КАНН).

La première seule est due à un anticorps, particule amphotère de faible densité de charge, de point isoélectrique égal à 6,2/6,3 ; la deuxième ne paraît pas liée à une particule chargée ; les réactions de flocculation enfin, semblent se rattacher étroitement aux globulines du sérum.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le support matériel auquel il convient de rattacher les propriétés spécifiques qu'acquiert un sérum au cours de l'immunisation, reste encore à peu près inconnu. Généralement assimilé aux protéines de l'antisérum, aux globulines surtout, dont il possède les caractères généraux et ne peut être séparé, il semble cependant pouvoir en être distingué. Les tentatives faites pour l'isoler et le purifier ont, en effet, bien mis en évidence une *affinité* pour divers adsorbants, une *vitesse* d'adsorption et de libération qui ne sont pas celles des protéines. Toutefois, ces distinctions ne sont pas suffisantes pour qu'on puisse lui reconnaître, avec certitude, une individualité propre.

Les difficultés auxquelles se heurtent les méthodes chimiques utilisées pour isoler et purifier l'anticorps nous ont conduit à rechercher un moyen de le caractériser dans l'immunsérum lui-même. Nous nous sommes, dans ce but, servi d'une méthode d'électrophorèse, qui donne la possibilité d'étudier des propriétés propres à la surface d'une micelle colloïdale, et de la caractériser dans un milieu complexe où d'autres micelles l'accompagnent.

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons décrit le dispositif qui nous a permis de réaliser des champs élevés et des expériences de longue durée, sans élévation notable de la température, diffusion de l'ion métallique de la solution où plonge l'électrode positive, ni perturbations dues à l'osmose électrique. Les produits d'électrolyse sont *neutralisés* dès leur formation, et les modifications de pH réduites à de très faibles variations.

La complexité du milieu où nous opérons, la variation que subit la valeur du champ au cours de nos expériences, et surtout la nature des anticorps et des réactions qui permettent de les titrer, ne nous ont pas donné la possibilité de mesurer d'une manière absolue leur potentiel électrique. Mais une méthode comparative répondait aussi bien au but que nous poursuivions : c'est donc une *différence* dans le comportement des divers éléments de l'antisérum que nous avons essayé de mettre en évidence.

Cette méthode nous a permis de dépasser le point de vue auquel sont restées attachées les recherches de ce genre : nous n'avons pas seulement caractérisé l'anticorps par son point isoélectrique, nous avons aussi cherché à le distinguer des protéines par la densité de charge qu'il possède à des pH variés, choisis de part et d'autre de son point isoélectrique.

Pour effectuer correctement ces mesures de vitesse, nous avons dû modifier la technique habituelle utilisée pour titrer les antisérums ; nous avons cherché à lui donner une sensibilité et une précision qui la rendissent propre à traduire quantitativement les variations d'activité constatées après cataphorèse.

Nos recherches ont ainsi confirmé et précisé des expériences déjà anciennes, démontré l'erreur de certaines déterminations, et apporté quelques notions nouvelles à la connaissance des antisérums.

I. — On croyait savoir depuis longtemps que les agglutinines se transportaient dans un champ électrique, et qu'elles étaient amphotères (LANDSTEINER et PAULI, MICHAELIS).

Mais l'objection que l'on peut soulever contre ces conclusions n'avait jamais été réfutée : c'est qu'il est possible d'interpréter les faits observés aussi bien comme un *transport* de la substance active, que comme une *altération* accidentelle qu'elle aurait subie au cours de l'expérience. Une élévation trop brutale de température, un apport de substances étrangères, une modification du sérum lui-même, pourraient favoriser ou retarder l'action spécifique de l'immunsérum.

Cette objection n'est pas sans valeur, et nous rappelons les arguments que nous proposons pour la combattre.

1° Les gels et les membranes que nous utilisons ont été contrôlés avec soin : ils sont tous sans action sur l'anticorps cataphoré, ou sur la réaction qui permet de le titrer.

2° La disposition de notre appareil et la précision de nos titrages nous ont permis de montrer que l'accroissement d'activité constaté à l'un des pôles compensait *quantitativement* l'affaiblissement subi par l'autre.

3° Toutes les réactions par lesquelles nous avons titré l'anticorps dans un même antisérum ou dans des sérums différents, donnent des valeurs identiques aux accroissements et aux diminutions d'activité qu'il acquiert dans les liquides anodique et cathodique. Ces modifications ne sont pas dues à l'apparition d'un facteur capable d'agir directement sur la réaction, car après cataphorèse d'un sérum anti-globulaire, on devrait observer des effets opposés selon qu'on utilise, pour les titrages, la réaction directe, (hémolyse) ou la fixation du complément. En l'absence d'antigène, d'ailleurs, les sérums témoins, anodique et cathodique, n'ont pas d'action sur le système hémolytique utilisé.

4° Les effets constatés après le passage du courant sont indépendants de l'âge, de la nature ou de la concentration du sérum, comme de la nature de l'anticorps (hémolysant, agglutinant, précipitant), ou de l'antigène (globules, bactéries, protéines). Ils sont uniquement fonction de la *valeur du champ*, du *temps* de passage du courant, et du *pH* du milieu.

Nuls pour un *pH* de 6,2/6,3, ils prennent des valeurs opposées de part et d'autre de ce point, et croissantes à mesure qu'on s'en éloigne.

II. — *Les anticorps se transportent donc dans un champ électrique.* Ce sont des corps *amphotères*, dont le point isoélectrique, égal à 6,2/6,3 est différent de celui des protéines de l'antisérum. (4,7 pour la sérum albumine, 5,2 pour la sérum globuline). Par dialyse ou traitement par le sulfate d'ammonium à demi satura-

tion, les globulines subissent des transformations irréversibles ; l'anticorps demeure inaltéré ; isolé avec la solution dialysée ou avec le précipité formé par le sulfate d'ammonium, il conserve le point isoélectrique qu'il possédait dans le sérum originel.

La valeur que nous avons déterminée s'écarte des chiffres variés que de nombreux auteurs donnent comme point isoélectrique à l'agglutinine.

Nous avons montré que la seule cause de ces divergences était la *nature et la concentration* des solutions salines dans lesquelles l'électrophorèse avait été faite. Des ions polyvalents comme le citrate⁻⁻⁻ ou le calcium⁺⁺, et même des ions monovalents comme CH^3COO^- et NH^3+ , peuvent modifier la valeur ou le signe de la charge des ampholytes. Le sens de leur transport ne s'inverse plus au point isoélectrique, mais à des *pH* plus *acides* (anions polyvalents) ou plus *alcalins* (cathions actifs). Comme enfin ces déviations prennent des valeurs particulières pour chaque substance, la comparaison de particules diverses perd toute signification.

III. — La densité de charge des anticorps reste très faible, même à des *pH* éloignés de leur point isoélectrique. Ce dernier caractère seul suffirait à le distinguer des protéines du sérum ; il nous a permis de l'obtenir en solution dépourvue de traces décelables de protéines (le réactif employé étant l'acide phosphotungstique).

IV. — Les propriétés diverses, agglutinantes, hémolysantes, précipitantes qui apparaissent dans un sérum après l'injection *d'un seul antigène* se comportent de la même manière dans un champ.

On ne peut pas davantage distinguer, par cataphorèse, les anticorps correspondants à des antigènes distincts, dont on a pu, par saturation, démontrer la pluralité : l'anticorps d'un sérum anti-globulaire possède le même point isoélectrique, et la même faible densité de charge qui caractérisent un anticorps anti-bactérien.

V. — Il semble donc :

1° Que les propriétés spécifiques des immunsérums peuvent se rattacher à des particules matérielles possédant une individualité propre. Par leurs caractères généraux : mobilité dans le champ, caractère amphotère, elles se rapprochent des protéines, mais elles se distinguent des protéines connues existant dans le sérum à la fois par leur densité de charge, et par leur point isoélectrique.

2° La spécificité des anticorps n'intéresse pas leurs groupes ionisés, ou en intéresse un très petit nombre. Fait qui n'a rien de surprenant, des méthodes physiques et chimiques étant également impuissantes à distinguer entre-elles des protéines (albumines, globulines) immunologiquement différentes.

3° La faible densité de charge des anticorps est un caractère remarquable ;

elle indique que leurs molécules possèdent un très petit nombre de groupes ionisés *acides et basiques*, ou que la constante de dissociation de ces groupes est très faible.

4° La déviation que subit le point isoélectrique de l'anticorps en présence d'ions divers (citrate, acétate, Ca), est considérable.

On a cru pouvoir interpréter ces faits par des phénomènes d'électrisation de contact : accumulation à la surface des grains de charges négatives ou positives dues aux ions adsorbés. Comme l'importance de ces phénomènes est en rapport avec la taille des micelles, on serait alors conduit à attribuer à l'anticorps une très grosse molécule.

Cette théorie n'est cependant pas absolument satisfaisante ; elle ne rend pas compte de l'effet que possèdent des ions monovalents tels que CH_3COO^- et NH_4^+ ; elle n'explique pas davantage pourquoi, à pH 6,3, où la charge de valence de l'anticorps est nulle, sa vitesse reste très faible en présence de CaCl_2 par exemple.

Il est peut-être possible d'interpréter autrement ces faits. Dans des solutions contenant des sels tels que du citrate trisodique, de l'acétate de soude, (base forte, acide faible) les groupes *acides* des molécules d'anticorps conservent la constante d'ionisation qu'ils ont dans des solutions de NaCl. La dissociation des groupes *alcalins* est, au contraire, fortement regressée, ce qui expliquerait la déviation du point isoélectrique vers les pH acides, sans que la vitesse, dépendant toujours de l'ionisation des groupes acides, puisse dépasser la valeur qu'elle prend, en présence de NaCl, dans un milieu plus alcalin. Les courbes de vitesse de l'anticorps cataphoré en présence de sels divers, et qui ont été reportées dans la figure 9, sont en effet toutes parallèles, ce qui semble bien confirmer cette hypothèse.

VI. — L'électrophorèse permet de distinguer les anticorps de substances possédant des réactions biologiques voisines.

Ni les propriétés hémolytiques des sérums frais (*), ni le pouvoir de fixer le complément que possèdent les sérums des syphilitiques en présence d'« antigène », ne paraissent liés à une particule matérielle mobile dans un champ électrique.

Les réactions de floculation (réaction de Kahn), semblent pouvoir être rattachées aux globulines du sérum, comme le pouvoir alexique des sérums frais ⁽⁵⁰⁾.

Ces recherches ont été faites à l'Institut de Biologie Physico-chimique, dans le laboratoire de M. P. GIRARD. Je le remercie de m'avoir suggéré l'idée de ce travail, et donné la possibilité de le réaliser.

Je remercie aussi M. E. PITRES de sa constante collaboration.

(*) Ces recherches n'ont pas encore été publiées.

BIBLIOGRAPHIE

- ⁽¹⁾ W. HARDY, *Journ. of Physiol.*, **24**, 288 (1899).
- ⁽²⁾ W. HARDY, *Journ. of Physiol.*, **33**, 225 et 250 (1905).
- ⁽³⁾ T. KUDO, *Bioch. Zeits.*, **16**, 233 (1909).
- ⁽⁴⁾ P. RÖMER, *Berl. Klin. Woch.*, S, 209 (1904).
- ⁽⁵⁾ H. BECHHOLD, *Müench. Med. Woch.*, **39**, 1921 (1907).
- ⁽⁶⁾ V. HENRI, *Bioch. Zeits.*, **16**, 472 (1909).
- ⁽⁷⁾ P. CERNQVODEANU et V. HENRI, *C. R. Soc. Biol.*, **62**, 669 et 671 (1907).
- ⁽⁸⁾ H. BIERRY, V. HENRI et G. SHAEFFER, *C. R. Soc. Biol.*, **63**, 226 (1907).
- ⁽⁹⁾ C. FIELD et O. TEAGUE, *Journ. of Exp. Med.*, **9**, 86 et 222 (1907).
- ⁽¹⁰⁾ O. TEAGUE et BUXTON, *Journ. of Exp. Med.*, **9**, 254, (1907).
- ⁽¹¹⁾ C. TODD, *Brit. Journ. of Exp. Path.*, **8**, 369 (1927).
- ⁽¹²⁾ J. KLIGER, *Brit. Journ. of Exp. Path.*, **12**, 69-172-178 (1931).
- ⁽¹³⁾ L. OLITZKI et C. LONG, *Brit. Journ. of Exp. Path.*, **50**, 263 (1929).
- ⁽¹⁴⁾ L. GUASTALLA, *C. R. Soc. Biol.*, **107**, 508 (1931).
- ⁽¹⁵⁾ K. LANDSTEINER et W. PAULI, *Wien. Klin. Woch.*, **13**, 1009 (1908).
- ⁽¹⁶⁾ L. MICHAELIS, *Bioch. Zeits.*, **16**, 81 (1909).
- ⁽¹⁷⁾ L. MICHAELIS et D. TAKAHASI, *Bioch. Zeits.*, **29**, 439 (1910).
- ⁽¹⁸⁾ L. MICHAELIS et H. DAVIDSOHN, *Bioch. Zeits.*, **33**, 156 (1911).
- ⁽¹⁹⁾ H. I. PRICE et W. LEWIS, *Trans. of Faraday Soc.*, **29**, 775 (1933).
- ⁽²⁰⁾ H. GEIGER, *Proc. of Royal Soc.*, **37**, 368 (1931).
- ⁽²¹⁾ P. GIRARD et M. LOURAU, *C. R. Ac. Science*, **193**, 1081 (1934).
- ⁽²²⁾ P. GIRARD et M. LOURAU, *C. R. Soc. Biol.*, **106**, 1007 (1934).
- ⁽²³⁾ P. GIRARD et M. LOURAU, *C. R. Soc. Biol.*, **106**, 1010 (1934).
- ⁽²⁴⁾ E. PONDER, *Proc. of Royal Soc.*, **106**, 506, 543 (1930) ; **110**, 18 (1932).
- ⁽²⁵⁾ Th. MADSEN, *Zeits. für Hyg. u. Inf. Krank.*, **63**, 617 (1899).
- ⁽²⁶⁾ C. COULTER, *Journ. of Gen. Physiol.*, **9**, 541 (1927).
- ⁽²⁷⁾ H. EAGLE, O. SMITH et P. VICKERS, *Journ. of Exp. Med.*, **63**, 617 (1936).
- ⁽²⁸⁾ S. P. L. SÖRENSEN, *C. R. Travaux Lab. Carlsberg*, **12**, 68 (1917).
- ⁽²⁹⁾ A. TISELIUS, *Nova acta Soc. Scient. Upsala, Série 4, N° 4*, **7** (1930).
- ⁽³⁰⁾ P. KÖNIG et W. PAULI, *Bioch. Zeits.*, **252**, 324 (1932).
- ⁽³¹⁾ H. A. KREBS, *Klin. Woch.*, **4**, 1390 (1925).
- ⁽³²⁾ P. RONA et L. MICHAELIS, *Bioch. Zeits.*, **28**, 193 (1910).
- ⁽³³⁾ F. HOWITT et E. PRIDEAUX, *Proc. of Royal Soc. (B)*, **112**, 24 (1933).
- ⁽³⁴⁾ THE SVEDBERG et SJOEGREN, *J. Am. Chem. Soc.*, **50**, 3318 (1928).
- ⁽³⁵⁾ A. S. MAC FARLANE, *Bioch. Journ.*, **29**, 407 et 660 (1935).
- ⁽³⁶⁾ W. BILTZ, H. MUCH et C. SIEBERT, *Zeits. f. Diet. u. Phys. Ther.*, **8**, 19 (1905).
- ⁽³⁷⁾ A. V. SZENT GYORGYI, *Bioch. Zeits.*, **113**, 36 (1921).
- ⁽³⁸⁾ V. SCHROEDER, *Bioch. Zeits.*, **65**, 81 (1930).
- ⁽³⁹⁾ L. OLITZKI, *Journ. of Immunol.*, **24**, 505 (1933).
- ⁽⁴⁰⁾ R. OTTENBERG et F. A. STENBUCH, *Journ. of Gen. Physiol.*, **8**, 345 (1926).
- ⁽⁴¹⁾ A. H. ABRAMSON, *Journ. of Gen. Physiol.*, **14**, 163 (1931).
- ⁽⁴²⁾ C. COULTER, *Journ. of Gen. Physiol.*, **2**, 309 (1921).
- ⁽⁴³⁾ G. SCHIBBLEY, *Journ. of Exp. Med.*, **40**, 443 (1925) ; **44**, 667 (1926).
- ⁽⁴⁴⁾ A. H. ABRAMSON, *Journ. of Gen. Phys.*, **16**, 593 (1933).

- ⁽⁴⁵⁾ J. NORTHROP et DE KRUIF, *Journ. of Gen. Phys.*, **4**, 655 (1921-22).
 - ⁽⁴⁶⁾ M. MAC CUTCHEON, S. MUDD, M. STRUMIA et B. LUCKE, *Journ. of Gen. Phys.*, **13**, 669 (1930).
 - ⁽⁴⁷⁾ L. FELTON, *Journ. of Inf. Deas.*, **43**, 543 et **42**, 248 (1928).
 - ⁽⁴⁸⁾ M. HEILDERBERGER, et F. KENDALL, *Journ. of Exp. Med.*, **50**, 809 (1929).
 - ⁽⁴⁹⁾ E. JOFFE, *Journ. of Gen. Physiol.*, **18**, 615 (1935).
 - ⁽⁵⁰⁾ P. GIRARD, M. LOURAU et E. PITRES, *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 408 (1935).
 - ⁽⁵¹⁾ G. SANDOR, *Bull. Soc. Chimie Biol.*, **18**, 877 (1936).
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
--------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUES

1° DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL	5
a) Historique.....	5
b) Description du dispositif expérimental.....	7
2° MÉTHODES DE DOSAGE.....	11

DEUXIÈME PARTIE

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. — SÉRUMS ANTI-GLOBULAIRES.....	17
1 ^{re} partie.....	17
1° Historique.....	17
2° Recherches personnelles.....	17
2 ^e partie.....	24
II. — SÉRUMS AGGLUTINANTS.....	27
1° Historique.....	27
2° Recherches personnelles.....	28
a) Sérums anti-bactériens.....	29
b) Hémo-agglutinines naturelles.....	30
c) Critique des méthodes et des résultats.....	31
Cataphorèse en présence d'anions polyvalents.....	32
Cataphorèse en présence de cations polyvalents.....	33
Conclusion.....	37
III. — SÉRUMS PRÉCIPITANTS.....	39
IV. — SÉRUMS SYPHILITIQUES.....	42
1° Réaction de Bordet-Wassermann.....	43
2° Réaction de flocculation.....	44
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.....	47

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

LES MOUVEMENTS AMOEBOÏDES

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 10 Décembre 1936

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

C. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris.

S. CHARLÉTY.

Saint-Amand (Cher). — Imprimerie R. BUSSIÈRE. — 2-3-1937.
